

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DISCIPLINA DE METODOLOGIA APLICADA A CONCLUSÃO DE CURSO

**ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE A
CLOSTRIDIOSE ENTEROTÓXICA CANINA**

Renata Bianco Demartini

PORTO ALEGRE

2019/1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DISCIPLINA DE METODOLOGIA APLICADA A CONCLUSÃO DE CURSO

**ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE A
CLOSTRIDIOSE ENTEROTÓXICA CANINA**

Autor: Renata Bianco Demartini

Monografia apresentada à
Faculdade de Veterinária como
requisito parcial para obtenção
da Graduação em Medicina
Veterinária

Orientadora: Luciana Sonne

PORTO ALEGRE

2019/1

Renata Bianco Demartini

**ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE A
CLOSTRIDIOSE ENTEROTÓXICA CANINA**

Aprovado em 5 JUL 2019

APROVADO POR:

Prof. Dra. Luciana Sonne

Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr. David Driemeier

Membro da Comissão

M.V. Mônica Slavieiro

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, que nunca deixaram de me incentivar a estudar e vibram a cada conquista minha. Obrigada por terem acreditado em mim e terem permitido que eu conseguisse estudar em tempo integral, me dedicando apenas aos estudos. Sem vocês, nada disso teria sido possível!

Não poderia também deixar de agradecer à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial a Faculdade de Medicina Veterinária, por terem proporcionado a mim e aos colegas um estudo público gratuito e de qualidade.

Aos amigos, especialmente à Deise, ao Mateus, ao Diefer, à Gi, ao Allan, à Débora e a Táli, por além de terem me rendido muitos momentos de relaxamento e diversão durante esta bela, porém cansativa jornada, sempre foram compreensivos e me apoiaram muito naqueles “fines de apenas estudos”. Obrigada migos! E a minha linda Raquel, obrigada pelo amor, apoio e compreensão de sempre! Te amo!

Agradeço a minha querida orientadora Luciana Sonne, pelos ensinamentos e pela disponibilidade em todos os momentos que precisei. Agradeço também, aos queridos professores e pós-graduandos do Setor de Patologia Veterinária, que além de proporcionarem boas risadas e companheirismo, sempre se disponibilizaram a me ajudar! Um agradecimento em especial à Mônica e à Luísa, que me ajudaram tanto e com tanto carinho, que ficarão para sempre na minha memória.

Muitíssimo obrigada a cada um que fez parte desta trajetória.

RESUMO

A clostridiose enterotóxica canina é uma doença que afeta o trato gastrointestinal levando à diarreias tipicamente hemorrágicas; porém, a gravidade pode ser variável. Na maioria das vezes, os animais se recuperam e o tratamento é eficaz; mas uma pequena parte dos casos desenvolve a forma potencialmente fatal da doença e a morte aguda costuma ocorrer em poucas horas ou dias após o início dos sinais clínicos. A forma aguda da doença é mais conhecida como Síndrome da Diarreia Hemorrágica Aguda ou Gastroenterite Hemorrágica Canina. Os agentes envolvidos são *Clostridium perfringens* Tipo A e *Clostridium difficile*, que são bacilos Gram positivos anaeróbicos, que estão em grande quantidade no ambiente, mas também podem ser comensais do trato gastrointestinal. Por meio de suas toxinas, causam doença ao sofrerem crescimento e esporulação excessivos, secundariamente a uma alteração do microambiente intestinal; e o deflagrador pode ser um de vários fatores distintos, embora mudanças súbitas na dieta sejam mais reconhecidas. Devido à pequena frequência de casos fatais, a maioria dos trabalhos que estudam gastroenterite hemorrágica canina são *in vivo* e os estudos que avaliaram as alterações anatomopatológicas *post mortem* em caninos acometidos, limitaram-se a poucos ou isolados casos. Entre os anos de 2014 a 2019 foram revisados os casos de gastroenterite hemorrágica canina fatal nos registros de necropsia do Setor de Patologia Veterinária da UFRGS, sendo observados dezesseis casos no período. Dados referentes ao histórico clínico fornecidos pelos médicos veterinários responsáveis pelo caso foram compilados e analisados. Os animais mais afetados foram cães de raças de pequeno porte, de adultos a idosos e os principais fatores envolvidos no desenvolvimento da clostridiose canina relatados foram mudança na dieta e imunossupressão. Observou-se alterações frequentemente tanto no intestino grosso quanto no intestino delgado e estômago, confirmando o caráter difuso da lesão no trato gastrointestinal. Os principais achados macroscópicos foram estado corporal bom a regular, fezes sanguinolentas na região perineal, conteúdo sanguinolento no lúmen, mucosa e serosa difusamente avermelhadas. Na histologia, o mais observado foi hemorragia acentuada, com bactérias bacilares Gram positivas aderidas na mucosa necrótica e no lúmen intestinal, além de necrose e congestão.

Palavras chave: Gastroenterite Hemorrágica Canina, Síndrome da Diarreia Hemorrágica Aguda, *Clostridium perfringens* Type A, *Clostridium difficile*.

ABSTRACT

Canine enterotoxic clostridiosis is a disease that affects the gastrointestinal tract leading to a typical haemorrhagic diarrhea; however, gravity can be variable. Most of the time, the animals recover and the treatment is effective; but a small part of the cases develops the potentially fatal form of the disease and acute death usually occurs within a few hours or days after the onset of clinical signs. The acute form of the disease is better known as Acute Hemorrhagic Diarrhea Syndrome or Canine Hemorrhagic Gastroenteritis. The etiological agents involved are Clostridium perfringens Type A and Clostridium difficile, which are Gram-positive anaerobic bacilli, spread in great quantity in the environment, but may also be commensal of the gastrointestinal tract. Through their toxins, they cause disease by undergoing excessive growth and sporulation, secondary to a change in the intestinal microenvironment; and the trigger may be one of several distinct factors, although sudden changes in diet are more recognized. Due to the low frequency of fatal cases, most studies of canine hemorrhagic gastroenteritis are in vivo, and studies evaluating postmortem anatomopathological changes in affected canines have been limited to a few or isolated cases. Between 2014 and 2019, cases of fatal canine hemorrhagic gastroenteritis were reviewed in the necropsy registries of the Department of Veterinary Pathology of UFRGS, with sixteen cases observed for this period. The clinical history data provided by the vets responsible for the case were compiled and analyzed. The most affected animals were small breed dogs, adults to the elderly and the main factors involved in the development of canine clostridiosis reported were dietary change and immunosuppression. Changes were frequently observed in both the large intestine and the small intestine and stomach, confirming the diffuse nature of the lesion in the gastrointestinal tract. The main macroscopic findings were good to regular body condition, bloody feces in the perineal region, bloody lumen content and diffusely reddish mucosa and serosa. In histology, the most observed findings were marked hemorrhage, with Gram-positive bacilli bacteria adhere to the necrotic mucosa and intestinal lumen, in addition to necrosis and congestion.

Keywords: *Canine Hemorrhagic Gastroenteritis, Acute Hemorrhagic Diarrhea Syndrome. Clostridium perfringens Type A, Clostridium difficile.*

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Achados predominantes de necropsia por órgãos do trato gastrointestinal observados em 16 cães diagnosticados com clostridiose no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS.....28
- Tabela 2** – Frequência dos achados microscópicos, em 15 cortes de intestino grosso, 16 de intestino delgado e 14 de estômago; de necropsias de cães diagnosticados com clostridiose no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS.....31
- Tabela 3** – Achados predominantes de necropsia por órgãos do trato gastrointestinal observados em 16 cães diagnosticados com clostridiose no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS.....35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Necropsia de um canino com clostridiose. Observa-se sangue na região perineal.....29
- Figura 2** – Necropsia de um canino com clostridiose. Observa-se serosa intestinal difusamente avermelhada.....29
- Figura 3** – Necropsia de um canino com clostridiose. Observa-se mucosa intestinal necrohemorrágica.....30
- Figura 4** – Necropsia de um canino com clostridiose. Observa-se mucosa estomacal de coloração vermelho escuro e conteúdo sanguinolento.....30
- Figura 5** - Corte histológico de estômago de um canino diagnosticado com clostridiose. Observa-se bactérias bacilares aderidas à superfície da mucosa necrótica. Coloração de HE, obj. 40X.....32
- Figura 6** – Corte histológico de intestino de um canino diagnosticado com clostridiose. Observa-se bactérias bacilares aderidas ao longo da superfície da mucosa necrótica. Coloração de HE, obj. 40X.....33
- Figura 7** – Corte histológico de intestino de um canino diagnosticado com clostridiose. Bactérias bacilares aderidas à mucosa intestinal, em maior aumento (obj. 100X). Coloração de HE.....33
- Figura 8** – Corte histológico de intestino de um canino diagnosticado com clostridiose. Observa-se hemorragia acentuada em camada submucosa. Coloração de HE, obj.10X.....34
- Figura 9** – Corte histológico de intestino de um canino diagnosticado com clostridiose. Observa-se bactérias bacilares Gram positivas aderidas à mucosa intestinal, pela coloração de Gram, obj 40X.....34

LISTA DE ABREVIATURAS

- CDT: Toxina binária de *Clostridium difficile*
- CPB2: Toxina Beta 2 de *Clostridium perfringens*
- CPE: Enterotoxina de *Clostridium perfringens*
- DACD: Diarreia Associada à *Clostridium difficile*
- DACP: Diarreia Associada à *Clostridium perfringens*
- GHC: Gastroenterite Hemorrágica Canina
- HE: Hematoxilina e Eosina.
- SDHA: Síndrome da Diarreia Hemorrágica Aguda
- TcdA: Toxina A de *Clostridium difficile*
- TcdB: Toxina B de *Clostridium difficile*
- UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 CLOSTRIDIOSES	12
2.2 AGENTES ETIOLÓGICOS	13
2.2.1 <i>C. perfringens</i> e sua associação com diarreia em cães	13
2.2.1.1 Enterotoxina de <i>Clostridium perfringens</i> (CPE)	15
2.2.1.2 Toxinas NetF, NetG e NetE	15
2.2.1.3 Toxina beta 2 (CPB2)	16
2.2.2 <i>C. difficile</i> e sua associação com diarreia em cães	16
2.2.2.1 <i>C. difficile</i> como potencial agente zoonótico	18
2.3 DEFLAGRADORES DA DIARREIA CLOSTRIDIAL	19
2.4 PATOGENIA	20
2.4.1 Mecanismo de ação das toxinas de <i>C. perfringens</i> Tipo A	21
2.4.2 Mecanismo de ação das toxinas de <i>C. difficile</i>	22
2.5 ASPECTOS CLÍNICOS E TRATAMENTO	22
2.6 ASPECTOS MACROSCÓPICOS E MICROSCÓPICOS	23
2.7 EPIDEMIOLOGIA	24
2.8 DIAGNÓSTICO	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4 RESULTADOS	27
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

A clostridiose enterotóxica canina é uma doença que afeta o trato gastrointestinal de cães levando a diarreias tipicamente hemorrágicas, porém, a gravidade pode ser variável. Na maioria das vezes, os animais se recuperam e o tratamento é eficaz; mas uma pequena parte dos casos desenvolvem a forma potencialmente fatal da doença e a morte aguda costuma ocorrer em poucas horas ou dias após o início dos sinais clínicos (MARKS, 2015). A forma aguda e hemorrágica da doença é usualmente conhecida por Gastroenterite Hemorrágica Canina (GHC) ou Síndrome da Diarreia Hemorrágica Aguda (SDHA), porém existem ainda diversos outros termos sinônimos (LEIPIG-RUDOLPH *et al.*, 2019).

A clostridiose é principalmente reconhecida em cães, mas também ocorre em gatos, em menor proporção (WILLARD, 2015; WEESE, 2011). *Clostridium perfringens* tipo A e *Clostridium difficile* são os enteropatógenos comumente envolvidos, e causam a doença por meio de suas toxinas, liberadas em decorrência de crescimento bacteriano e consequente esporulação massivos (WEESE, 2011). Esse crescimento dessas cepas toxigênicas em cães parece ocorrer secundariamente à uma alteração e ruptura do microambiente intestinal; e o deflagrador pode ser um de vários fatores distintos e incluem mudanças súbitas na dieta, administração de antibacterianos ou co-infecção com outro enteropatógeno (MARKS, 2015).

Estudos recentes vêm sugerindo uma forte associação dos casos de GHC associada à *C. perfringens* à uma nova toxina recém descoberta chamada NetF (SINDERN *et al.*, 2019, UZAL, 2016; GOHARI *et al.*, 2015). No entanto, tanto NetF quanto as outras toxinas descritas para *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile* podem ser encontradas nas fezes de animais saudáveis; portanto, o papel de ambos os agentes permanece incompletamente caracterizado, e o diagnóstico dessas infecções ainda é um desafio (DINIZ *et al.*, 2016).

Alguns estudos caracterizaram lesões anatomopatológicas *post mortem*, entretanto se limitaram a um número pequeno de cães, sendo na maioria deles casos isolados (DINIZ *et al.*, 2016; DANTAS, 2014; SCHLEGEL *et al.* 2012; SASAKI *et al.* 1999; PRESCOTT *et al.*, 1978). O presente estudo pretende caracterizar as lesões *post mortem* com um número superior de caninos.

Assim, o objetivo deste trabalho é descrever as características epidemiológicas, macroscópicas e microscópicas da clostridiose canina de cães necropsiados no Setor de Patologia Veterinária da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Clostridioses

As clostridioses compreendem as infecções e intoxicações causadas por bactérias do gênero *Clostridium* (LOBATO *et al.*, 2007), bastonetes usualmente Gram positivos, anaeróbios obrigatórios na grande maioria das espécies (VOS *et al.*, 2009). Este gênero foi primeiramente descrito por Prazmowski em 1880 e pertence à família *Clostridiaceae*, ordem Clostridiales, classe *Clostridia*, e por sua vez, ao filo Firmicutes (VOS *et al.*, 2009). É responsável por causar doenças em diversas espécies animais, incluindo, também, humanos; e tem importância não só para a saúde animal e humana, como também reflete perdas significativas em animais de produção, particularmente em ruminantes (IDRISSI; WARD, 2010). Essa importância é exacerbada pela ampla difusão geográfica desse gênero, estando essas bactérias distribuídas por todo o mundo (DUCHESNES *et al.*, 2006), em decorrência de serem saprófitos e principalmente, da sua habilidade de formarem, em condições anaeróbias, endósporos; os quais são muito resistentes a agentes físicos e desinfetantes (CARTER, 1998). Dessa maneira, as bactérias clostridiais podem se manter por longos períodos no solo (LOBATO *et al.*, 2013), na água, nas plantas e nos alimentos (PIRES, 2011), mas também na pele e mucosa (especialmente no trato gastrointestinal) de animais e humanos, onde é possível viverem de forma comensal (DUCHESNES *et al.*, 2006; PIRES, 2011).

O gênero contém mais de 225 espécies identificadas, porém, apenas algumas são consideradas patogênicas (LOBATO *et al.*, 2013). Esta patogenicidade está associada diretamente à produção de potentes toxinas decorrentes da multiplicação bacteriana, que vão agir localmente e/ou de forma sistêmica (IDRISSI; WARD, 2010). Os clostrídios são os maiores produtores de toxinas dentre todos os tipos de bactéria (SILVA; LOBATO, 2015). Através das toxinas, é possível classificar as clostridioses em três categorias principais, que são baseadas nos tipos de lesões, na origem da produção de toxina e no principal local de infecção (IDRISSI; WARD, 2010). São elas: clostridioses neurotóxicas, histotóxicas e entéricas (ROOD, 2016). Neste trabalho, o foco será na clostridiose entérica em caninos, porém, esta também pode ser observada nos animais domésticos em geral, animais silvestres, e seres humanos (SONGER, 1996). Em animais de produção, as principais enterites e enterotoxemias clostridiais são causadas por *C. perfringens*, *C. difficile*, *C. novyi*, e *C.*

haemolyticum (estas duas últimas tipicamente hepáticas) e configuram importantes prejuízos econômicos (LOBATO *et al.*, 2013).

Em caninos, dentro de um panorama geral, as enterites que levam a diarreias agudas do intestino delgado, por agentes infecciosos e parasitários, geralmente têm Parvovirus, *Giardia*, *Salmonella*, *Campylobacter* e helmintos como importantes agentes etiológicos (HALL; SIMPSON, 2016). Porém, dos patógenos bacterianos mais frequentemente associados, inclui-se *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Helicobacter* spp. e *Escherichia coli* enterotoxigênica (TRIOLO; LAPPIN; 2005). Da mesma forma, as diarreias de intestino grosso originárias de colites agudas, crônicas ou mistas, têm como principais agentes infecciosos e parasitários *Trichuris*, *Ancylostoma*, *Histoplasma*, *Campylobacter*, *Salmonella* e *C.perfringens*, sendo estas três últimas, bactérias importantes associadas a enterocolites (TRIOLO; LAPPIN; 2005).

As enterites clostridiais em cães são aquelas causadas por *C. perfringens* e *C. difficile*, sendo estes dois agentes comumente descritos como enteropatógenos em cães (WEESE, 2011). No entanto, o papel deles na patogênese da doença ainda não é bem caracterizado, e o diagnóstico dessas infecções ainda é um desafio (DINIZ *et al.*, 2016; DINIZ *et al.*, 2018).

2.2 Agentes etiológicos

2.2.1 *C. perfringens* e sua associação com diarreia em cães

Clostridium perfringens, dentre as espécies de *Clostridium*, é considerada a maior produtora de toxinas e também a mais difundida (SILVA; LOBATO, 2015). Além disso, *C. perfringens* é a mais importante causa de doença clostridial entérica em animais domésticos (SONGER, 1996); e em cães é apontada comumente como bactéria causadora de diarreia canina, juntamente com *Clostridium difficile* (WEESE,2011). Ambas as espécies podem ser encontradas de forma comensal, colonizando e compondo a microflora do trato gastrointestinal de cães, mas também existem algumas evidências que sugerem uma transmissão entre caninos. Quando acometidos, a doença pode se apresentar em diferentes graus de severidade, que vai desde diarreia leve e auto limitante até aguda e potencialmente fatal (MARKS, 2015). As diarreias ocorrem de forma aguda ou crônica, acometendo tanto o intestino delgado quanto o grosso, ou ambos; e podem apresentar ou não, muco e/ou sangue (WILLARD, 2015). De forma geral, o que se vê em caninos são diarreias agudas sanguinolentas, autolimitantes e nosocomial; diarreias crônicas; ou hemorrágica e

potencialmente fatal (WILLARD, 2015), sendo esta última mais conhecida como Gastroenterite Hemorrágica Canina (GHC).

C. perfringens é tradicionalmente classificado a partir de seus tipos toxigênicos (A-E), que são baseados na sua capacidade de produzir uma ou mais das principais toxinas patogênicas observadas para esta espécie de clostrídio: toxinas alfa, beta, épsilon e iota (SILVA, 2013a). Embora estas nomenclaturas tenham sido posteriormente definidas (GLENNY *et al.*, 1933), este esquema de toxinotipagem foi primariamente estabelecido por Wilsdon (1931), e constitui de base para o atual esquema de *C. perfringens*. As cepas do tipo A são as que produzem toxina alfa majoritariamente e são frequentemente associadas a doenças entéricas em animais domésticos como cães, aves, ruminantes, cavalos, porcos, e outras espécies (UZAL, 2016). Em caninos, *C. perfringens* isolados de diarreias são, praticamente, todos do tipo A (SAZAKI *et al.*, 1999; MARKS, 2010; WEESE, 2011; SILVA, 2013a), sendo comumente encontrado em mais de 80% dos cães saudáveis ou com diarreias (MARKS, 2011). Entretanto, outras diversas exotoxinas adicionais podem ser produzidas por esta espécie de clostrídios, e algumas poucas podem ter caráter patogênico (SONGER, 1996). Cavalcanti *et al.* (2004), divide as exotoxinas e exoenzimas de *C. perfringens* em toxinas maiores e menores, sendo as menores compostas pelas toxinas não tradicionais (alfa, beta, epsilon e iota), mas também podem ser chamadas de toxinas atípicas (UZAL, 2016).

Toxinas menores ou atípicas importantes que possam desempenhar algum papel na patogênese das doenças clostridiais entéricas como a enterotoxina e a toxina beta 2 foram anteriormente descritas; e novas toxinas têm sido recentemente descobertas, como por exemplo a toxina NetB, essencial para a ocorrência de enterites necróticas em galinhas (KEYBURN *et al.*, 2008). Com a descoberta de novas toxinas que se mostraram necessárias para doenças específicas mediadas por *C. perfringens*, foi proposto um esquema mais atual para a classificação dos isolados de *C. perfringens*, onde estabelece-se dois novos tipos toxigênicos: Tipo F e Tipo G, porém ainda não foram aprovados (ROOD *et al.*, 2018).

Nos caninos, as toxinas adicionais à toxina alfa, associadas a diarreias são a enterotoxina (CPE), a toxina beta 2 (CPB2) e mais recentemente a NetF, que parece ser fortemente associada com gastroenterite hemorrágica canina (UZAL, 2016).

2.2.1.1 Enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE)

A enterotoxina presente nas cepas de *C. perfringens* tipo A é responsável por uma das mais prevalentes formas de intoxicação alimentar e diarreia associada a antibióticos em humanos (UZAL, 2016); mas também está associada à diarreia canina aguda e crônica do intestino delgado e intestino grosso; e à Síndrome da Diarreia Hemorrágica Aguda (MARKS, 2015). Essa toxina é a mais bem compreendida dentre os principais atributos de virulência de *C. perfringens* (McDONEL, 1986) e sua produção é corregulada com a esporulação, sendo liberada após a lise da célula vegetativa e assim lesionando o tecido por agir como uma enterotoxina citotóxica (WEESE, 2001). Pode ser produzida por qualquer tipo toxigênico, visto que todos podem abrigar o gene *cpe*; porém, a distribuição global é relativamente baixa (em torno de 5%) e a maioria das cepas pertence ao tipo A (GREENE; PRESCOTT, 1998). Um estudo que isolou *C. perfringens* de mais de 100 cães, revelou 100% dos isolados positivos para tipo A, e cerca de 15% deles, também positivos para CPE (MARKS, 2002). Ela pode ser encontrada em isolados de conteúdo intestinal e fezes de cães diarreicos, indicando uma associação dessas cepas positivas para CPE, com diarreia canina; entretanto, diversos estudos apontam a presença dessa toxina em cães saudáveis, visto que esse clostrídio pode ser encontrado no intestino de caninos como parte da flora normal. Assim, a correlação de CPE com diarreia canina não pode ser considerada unicamente como critério de diagnóstico (UZAL, 2016; SCHLEGEL *et al.*, 2012; SILVA, 2013a).

2.2.1.2 Toxinas NetF, NetG e NetE

A alta prevalência do gene que abriga a enterotoxina nos cães com diarreia levavam a suspeita de que esse fator de virulência era unicamente responsável pela patogênese da diarreia canina associada à CP, entretanto, com a alta presença desse gene em cães saudáveis e a importante descoberta recente de três novas toxinas em associação com GHC, não se pode mais focar apenas em CPE (DINIZ *et al.*, 2016).

C. perfringens tipo A é uma importante causa de enterite necrótica em potros e diarreia hemorrágica aguda em cães, e a toxina NetF, recém descoberta, está envolvida diretamente com estas doenças (GOHARI; PARREIRA; PRESCOTT, 2016). Gohari *et al.* (2015) ao descobrirem NetF em isolados de *C. perfringens* tipo A de cães e potros que morreram dessas doenças; juntamente com outras duas toxinas (Net E e NetG), tiveram evidências para afirmar que NetF foi responsável por causar citotoxicidade tanto dela própria quanto das outras duas. Neste estudo, estabeleceu-se que NetE é vista sempre ligada à toxina

NetF (sendo também conhecida por NetE/F); e, NetG foi encontrado em apenas metade dos isolados de CP tipo A, o que corrobora com os achados de Diniz *et al* (2016).

Entretanto, todas as cepas isoladas positivas para NetF, também são positivas para *cpe*, o que sugere um sinergismo entre CPE e NetF (GOHARI et al.,2015; UZAL,2016; DINIZ et al.,2016)

Assim, a toxina NetF pode ser considerada importante e fundamental fator de virulência para a patogênese da diarreia hemorrágica canina, e está presente em cães acometidos não só por gastroenterites necróticas que são fatais, mas também naqueles que se recuperaram da doença (DINIZ *et al.*, 2016; GOHARI; PARREIRA; PRESCOTT, 2016; DINIZ *et al.*,2018).

Tanto NetF quanto NetE são codificadas no mesmo grande plasmídeo, enquanto que a enterotoxina e muitas vezes a toxina beta2 são codificadas em um grande plasmídeo separado, e as vezes em conjunto com NetG (GOHARI; PARREIRA; PRESCOTT, 2016).

2.2.1.3 Toxina beta 2 (CPB2)

A toxina beta 2 (CPB2) é conhecida por causar doenças entéricas em varias espécies animais incluindo porcos, cavalos, ovelhas e cabras (UZAL, 2016; SONGER; UZAL, 2005). Entretanto, algumas evidências científicas apontam e levam a crer que qualquer espécie pode ser acometida, incluindo cães (UZAL, 2016). De fato, estudos anteriores encontraram o gene para essa toxina em fezes de caninos (SILVA *et al.* 2013a, SCHELEGL, 2012) e estima-se que de 10 a 30% das cepas isoladas de *C. perfringens* tipo A, também são positivas para CPB2 (SILVA; LOBATO, 2015). Porém, a maioria destes estudos, basearam-se unicamente no isolamento de animais diarreicos e essas estirpes são usualmente isolado com prevalência similar de animais saudáveis, o que faz esse critério de diagnostico duvidoso (UZAL, 2016).

2.2.2 *C. difficile* e sua associação com diarreia em cães

C. difficile é bem conhecido por causar a maioria das diarreias nosocomiais e colites pseudomembranosas em humanos (SILVA; GUEDES; LOBATO; 2012). Entretanto, também pode afetar animais domésticos, sendo comum em suínos e equinos, mas também ocorre em cães, bovinos e animais de laboratório, como porquinhos-da-índia, coelhos e hamsters (KEEL & SONGER, 2006). Em cães, existem diversos relatos da ocorrência da doença, porém, ainda não se sabe bem a relevância clínica (DINIZ *et al.*, 2018; SILVA, 2014; MARKS, 2015). O

envolvimento de *C. difficile* na diarreia canina é fortemente sugerido por estudos que isolaram as cepas toxigênicas e as toxinas propriamente ditas, em cães diarreicos (DINIZ *et al.*, 2018; DINIZ *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2013; CLOOTEN *et al.*, 2008; WEESE; ARMSTRONG, 2003; STRUBLE *et al.*, 1994). Entretanto, também foram isolados de cães clinicamente saudáveis, em menor proporção, mas geralmente com taxas mais altas em abrigos, canis e hospitais veterinários (WEESE, 2011). A prevalência nas fezes de cães varia entre 10 e 40% (DIAB; UZAL; SONGER, 2016). Embora este clostrídio possa viver no trato gastrointestinal de forma comensal, *C. difficile* parece ser um patógeno incomum em carnívoros domésticos (DIAB; UZAL; SONGER, 2016; SILVA *et al.*, 2013; KEEL & SONGER, 2006). Porém, um aspecto importante reportado nesses estudos e mais evidente no *C. difficile* em relação ao *C. perfringens*, é o seu caráter nosocomial, em que o risco de colonização cresce significativamente com a hospitalização. Estes fatos, associados à administração de antibióticos e imunossupressores, parecem favorecer a colonização intestinal por *C. difficile* em cães internados (SILVA, 2014). No entanto, a antibioticoterapia é considerada como o fator predisponente mais comum para a infecção por *C. difficile* (DINIZ *et al.*, 2016). Assim como em *C. perfringens*, *C. difficile* pode causar diarreia canina variando desde diarreia leve e autolimitante até diarreia crônica e à síndrome diarreica hemorrágica aguda potencialmente fatal; acometendo tanto intestino grosso quanto delgado ou ambos (MARKS, 2015; WEESE, 2011; CAVE *et al.*, 2002). Interessantemente, a prevalência de *Clostridium difficile* é bastante alta no trato gastrointestinal de caninos em período neonatal, na ausência de sinais clínicos; e maior ainda nos filhotes diarreicos (PRYIA *et al.*, 2017; MARKS, 2015).

As toxinas envolvidas nos casos de infecção por *Clostridium difficile* são a toxina A (TcdA), a toxina B (TcdB), e uma toxina adicional binária ADP- ribosiltransferase (CDT; de *Clostridium difficile* toxina) (WEESE, 2011). As toxinas A e B constituem os principais fatores de virulência envolvidos na patogenia da diarreia associada à *C. difficile* (DACD) (MARKS, 2015) e são tipicamente produzidas juntas, embora existam cepas clinicamente relevantes e identificadas em cães, que são TcdA negativas, porém TcdB positivas (MARKS *et al.*, 2011). A toxina binária é considerada fator de virulência agravante em humanos, e já foi isolada em cães, porém se desconhece a sua verdadeira importância clínica (SILVA, 2014).

2.2.2.1 *C. difficile* como potencial agente zoonótico

Como dito anteriormente, *C. difficile* é isolado em maior proporção em abrigos, canis e hospitais veterinários, o que leva à possibilidade deste microorganismo ser considerado contagioso, embora a doença seja resultado da proliferação intestinal após um evento desencadeante. Da mesma maneira, evidências epidemiológicas de hospitais humanos sugerem que o agente possa ser transmitido de paciente para paciente, resultando em surtos (GREENE; JANG, 2015). Devido ao isolamento de *C. difficile* tanto em humanos quanto em animais e a esse caráter potencialmente contagioso, estudos recentes passaram a avaliar, através da técnica molecular de ribotipagem, se havia compartilhamento ou semelhança nas cepas toxigênicas de seres humanos e animais domésticos. Assim, observou-se que muitos ribotipos isolados de bovinos, suínos e cães eram os mesmos encontrados em seres humanos com infecção por *C. difficile* (ARROYO *et al.*, 2005; JHUNG *et al.*, 2008). Da mesma maneira, um estudo mostrou que trabalhadores em exposição ocupacional a suínos têm maior chance de colonização pelo agente; e os ribotipos de CD isolados eram os mesmos, reforçando a hipótese de transmissão entre espécies (NORMAN *et al.*, 2011). Ademais, o ribotipo 078 isolado em humanos, também foi encontrado em bezerros e 83% dos suínos no EUA (KEEL; BRASIER; POST, 2007).

O ribotipo mais frequente encontrado em caninos parece ser o 014/020, e é comumente associado à infecção por *C. difficile* em humanos em todo o mundo (SILVA *et al.*, 2015). No Brasil, o ribotipo 106, que também é comum em humanos, igualmente foi isolado de cães. Assim, entre os isolados toxigênicos compartilhados por humanos e cães, os ribotipos mais comuns são o 014/020 e 106 (DINIZ *et al.*, 2018, SILVA *et al.*, 2015). Stone *et al.* (2016) sugere animais de estimação como uma fonte potencial de infecção por *C. difficile* adquirida em humanos.

Mudanças na epidemiologia em humanos têm apontado também a possibilidade de ocorrência da doença em seres humanos sem prévia exposição a ambiente hospitalar e até mesmo na ausência de antibioticoterapia, o que pode levar a uma importante preocupação no sentido de prevenção da doença em animais domésticos (SAMIE *et al.*, 2008, SILVA; 2014). No entanto, mais estudos devem ser realizados, pois determinar se *C. difficile* é verdadeiramente contagioso ainda é difícil, visto que ele também é encontrado no trato intestinal de animais clinicamente sadios (MARKS, 2015).

2.3 Deflagradores da diarreia clostridial

Ao contrário dos seres humanos, em que a diarreia clostridial é causada primariamente pela ingestão desses microorganismos em alimentos, com consequente produção de enterotoxina; em cães parece ocorrer de forma secundária, por uma alteração e ruptura do microambiente intestinal. Dessa forma, a disbiose possibilita um crescimento excessivo de cepas comensais produtoras de toxinas, seguido de uma liberação massiva destas toxinas e o desenvolvimento subsequente da doença. O deflagrador desse crescimento clostridial e esporulação maciça pode ser um de vários fatores distintos e incluem mudanças súbitas na dieta, administração de antibacterianos ou co-infecção com outro enteropatógeno (MARKS, 2015).

Tratando-se de infecção por *C. perfringens* em cães adultos, esta é comumente associada a mudanças na alimentação (DINIZ *et al.*, 2016), como a mudança súbita para uma dieta de alta proteína (SILVA; LOBATO, 2015), mas também como resultado de GHC causada por outro patógeno como o Parvovírus, que também é descrito e sugerido como promotor de supercrescimento transitório de cepas enterotoxigênicas de *Clostridium* spp. (Silva *et al.*, 2017; Priya *et al.*, 2017; Turk *et al.*, 1992). O estudo de Silva *et al.* (2017) identificou em oitenta e dois caninos positivos para Parvovírus tipo 2, três cães positivos para *C. perfringens* enterotoxigênico, sendo os três com positividade para *cpe* e um com positividade adicional para *netE/F*; e um canino positivo para *C. difficile* toxigênico e toxinas A/B. Da mesma maneira, no trabalho recente de Sindern *et al.* (2019) nenhum canino (0/54) com sinais clínicos e positivos para Parvovírus apresentou gene *netE/F*, e apenas dois eram *cpe* positivos.

Entretanto, especificamente para infecção por *C. difficile*, a terapia antimicrobiana é mais bem conhecida como o fator predisponente mais comum (DINIZ *et al.*, 2016).

Embora o supercrescimento clostridial associado à disbiose intestinal seja bem reconhecida para a ocorrência da clostridiose canina, alguns autores também mencionam a possibilidade da ingestão de alimento contaminado com grandes números de CP enterotoxigênicos, os quais podem sobreviver à passagem pelo meio ácido do estômago, e sofrer esporulação no intestino delgado (MARKS, 2015).

2.4 Patogenia

As espécies do gênero *Clostridium* spp. geram lesões basicamente por meio de dois mecanismos: invasão de tecidos e produção de toxinas (LOBATO *et al.*, 2013). As enterites clostridiais são ocasionadas por meio destas toxinas, sendo todas as enterites por clostrídios produtoras de enterotoxemia (GELBERG, 2013). As toxinas formadas são resultantes da esporulação e lise da célula bacteriana.

Os microorganismos anaeróbios constituem uma porção significativa da microflora bacteriana normal de cães e gatos, sendo predominantes nas mucosas e responsáveis por uma boa parte da imunidade inata, na medida que regulam o número de aeróbicos. Entretanto, estes microorganismos também podem ser patógenos oportunistas, levando a doenças clínicas. Destes, *C. perfringens* e *C. difficile* são os anaeróbios mais importantes do intestino, que quando contêm os fatores de virulência apropriados, podem causar infecções nas mucosas através de crescimento excessivo e conseqüente produção exacerbada de suas toxinas. É interessante ressaltar que, embora estas espécies sejam comumente encontradas vivendo de forma comensal em cães, existem algumas evidências de que possam ser adquiridas de outros animais infectados ou até mesmo adquiridas do ambiente (GREENE; JANG, 2015). Infecções por *C. difficile*, inclusive, acredita-se que sejam iniciadas pela ingestão de esporos principalmente oriundos de animais infectados (SILVA, 2014), visto que evidências indicam que este organismo não é um patógeno entérico comum; e a associação de colonização por *C. difficile* com hospitais e abrigos de pequenos animais, foi demonstrada (UZAL, 2016). Entretanto, quando a microbiota intestinal está intacta, em geral, ela impede a colonização e estabelecimento deste agente. Quando há uma depleção e comprometimento da microflora causado por antibioticoterapia e quimioterápicos, animais não portadores podem comumente ter seus intestinos colonizados; e animais portadores saudáveis de *C. difficile*, podem ter seu crescimento exacerbado (SILVA, 2014). Além da morte rápida em relação ao início dos sinais clínicos, estes ocorrem também rapidamente após o evento desencadeador, visto que o tempo de incubação é bastante curto, ocorrendo entre seis a vinte e quatro horas após o evento (CARTER, 1998).

2.4.1 Mecanismo de ação das toxinas de *C. perfringens* Tipo A

Embora as doenças diarreicas clostridiais em caninos sejam ocorridas por *C. perfringens* tipo A, a toxina alfa tem pouca relevância clínica devido à baixa virulência. (WEESE, 2011). O potencial para doenças de cepas do tipo A provavelmente se relaciona mais com a presença ou ausência de CPE, toxina Beta 2, toxina NetE/F e toxina Net G do que com efeitos da toxina alfa.

A toxina CPE, uma vez liberada no lúmen intestinal, interage com a membrana celular da célula alvo, resultando na formação de poros criados em parte pela enterotoxina e em parte pela célula alvo, e que por meio deles ocorre uma perda de eletrólitos, levando à reversão do fluxo de íons e de água (gerando diarreia) e por fim, morte celular (GREENE; JANG, 2015). Modelos de experimentação em cães mostraram que a enterotoxina de *Clostridium perfringens* induz a acumulação de fluido e diarreia (BARTLETT; WALKER; ZIPRIN, 1972) reforçando seu caráter de enterotoxina citotóxica.

A recém descoberta toxina NetF faz parte de um importante grupo de toxinas necrozantes clostridiais, a família leucocidina-hemolisina formadoras de poros (GOHARI; PARREIRA; PRESCOTT, 2016). Essas toxinas formadoras de poros, onde inclui-se a NetF, são proteínas líquidas que são potentes agentes citolíticos secretados pelas bactérias a fim de se protegerem do sistema imunológico celular, interrompendo as barreiras epiteliais e liberando os nutrientes necessários para o seu crescimento e colonização. Os poros são formados pela ligação específica da NetF a receptores em membranas formando canais transmembrana que levam a danos celulares e comumente à lise (GOHARI *et al.*, 2015).

NetE e NetG, entretanto, carecem de evidências que apontem para uma atividade citotóxica, mesmo sendo expressos (GOHARI; PARREIRA; PRESCOTT, 2016). Uma possibilidade alternativa é que elas possam ter efeitos citotônicos, como efeitos pró-inflamatórios, além de talvez poder existir um sinergismo com outras moléculas de toxina (GOHARI *et al.*, 2015).

A toxina beta 2, por sua vez, ainda desempenha um papel incompleto na patogênese da clostridiose nos caninos, porém se sabe que a sua atividade biológica é semelhante a da toxina beta1, com uma atividade citotóxica possivelmente mais fraca. É importante ressaltar que cepas positivas para o gene *cpb2* nem sempre expressam a toxina (SCHOTTE; TRUYEN;

NEUBAUER, 2004) e usualmente são isolados com a mesma prevalência em animais saudáveis (UZAL, 2016).

2.4.2 Mecanismo de ação das toxinas de *C. difficile*

Acredita-se que a toxina A e a toxina B atuam em sinergismo, na medida em que TcdA inicia a lesão na mucosa do intestino, e possibilita assim, a ação citotóxica de TcdB (MARKS, 2015). A TcdA possui receptores na lâmina basal da célula epitelial e ao interagir com esta, quebra as junções celulares, permitindo a ação da TcdB, cujos receptores, encontram-se na região basolateral do epitélio, amplificando a lesão (SILVA, 2014). Ambas, depois de internalizadas por endocitose, inativam as proteínas Rho por glicosilação, levando à despolimerização e condensação de filamentos de actina, culminando com a desorganização e ruptura do citoesqueleto, arredondamento das células e morte celular (LYERLY *et al.*, 1988; MARKS, 2015).

Já a toxina binária ADP-ribosiltransferase, produzida por uma pequena porcentagem de cepas de *C. difficile*, pode agir sinergicamente com as toxinas A/B através de um mecanismo complementar, aumentando a despolimerização e desorganização do citoesqueleto e agravando o quadro clínico (GONÇALVES *et al.*, 2004).

Além da desorganização celular, esta toxina parece formar protusões nas células alvo baseadas em micro túbulos nas superfícies apicais das células alvos com consequente redirecionamento e extravasamento de proteínas do citosol formando uma malha densa na superfície celular apical que facilitaria a adesão e multiplicação de *C. difficile* no intestino (SONGER; HARMON; KEEL, 2016; SCHWAN *et al.*, 2009).

2.5 Aspectos clínicos e tratamento

Em ambas as infecções por *C. perfringens* e por *C. difficile* tanto intestino delgado quanto intestino grosso e estômago, podem apresentar sinais de diarreia, e por vezes têm acometimento concomitante, apresentando um caráter difuso da doença. A diarreia associada à *Clostridium perfringens* (DACP), entretanto, pode apresentar variação de gravidade, que vai desde a forma leve, discreta e autolimitada, até a forma aguda, hemorrágica, necrótica e potencialmente fatal, com inflamação grave da mucosa intestinal (MARKS, 2015). Embora informações sobre a clínica de DACP ainda sejam incompletas, existem relatos que mostram que a diarreia causada por toxinas A/B de *C. difficile* pode variar de aguda a crônica (DINIZ

et al., 2016), e de caráter subclínico até uma síndrome diarreica hemorrágica aguda e potencialmente fatal (MARKS, 2015).

Cães que apresentam gastroenterite hemorrágica, em geral têm os sinais clínicos iniciados por vômito súbito de conteúdo sanguinolento seguido por diarreia hemorrágica; embora uma pequena proporção de cães defequem fezes sanguinolentas, porém não diarreicas. Em torno de 50% dos pacientes apresentam-se prostrados; 20% têm dor na palpação abdominal e a maioria dos cães não aparecem desidratados. Nos casos periagudos, em geral, caninos que apresentavam-se saudáveis no dia anterior, aparecem mortos na manhã seguinte envoltos por uma poça de fezes sanguinolentas, que por vezes levam à suspeita pelos tutores, de envenenamento (GOHARI; PARREIRA; PRESCOTT, 2016).

Quando há uma suspeita da infecção por *C. perfringens*, o tratamento realizado é através de antibioticoterapia, com a utilização de Tilosina ou Amoxicilina, os quais parecem ser eficazes e têm efeitos colaterais mínimos. Metronidazol não parece ser tão eficaz quanto Tilosina e Amoxicilina. Se o diagnóstico estiver correto, espera-se uma resposta rápida que varia de uma a três semanas. Nos casos de diarreia crônica, alguns cães respondem bem com suplementação de fibra na dieta (WILARD, 2015).

Todavia, quando há suspeita de infecção por *C. difficile*, o tratamento é o mesmo realizado para doenças diarreicas, com terapia hídrica e eletrolítica de suporte, conforme a gravidade. Se o motivo deflagrador da diarreia foi antibioticoterapia, deve-se retirá-la se possível. Ainda não está muito clara a necessidade de antibiótico específico para *C. difficile* em todos os casos, visto que muitas vezes essa infecção pode ser auto limitante, porém o tratamento mais comumente utilizado é pelo uso de Metronidazol, por via oral preferencialmente. Vancomicina é bastante utilizada para o tratamento de pessoas, no entanto, não há evidências que a julguem eficazes e necessárias em cães (WEESE, 2011). Um estudo bastante recente sugeriu o transplante de microbiota fecal (TMF) de caninos saudáveis para caninos com diarreia recorrente associada à *C. difficile* como tratamento; motivado a partir de relatos bem sucedidos em humanos. O estudo mostrou que o TMF foi eficaz em um cão e afirma a possibilidade de reintroduzir a microbiota normal em pacientes, corrigindo a disbiose subjacente no intestino (SUJITA *et al.*, 2019).

2.6 Aspectos macroscópicos e microscópicos

As alterações de necropsia usualmente associadas aos casos fatais de GHC, em geral apresentam flacidez, congestão transmural, conteúdo sanguinolento no intestino delgado, com congestão acentuada e aquosa, conteúdos avermelhados presentes em ID e cólon, e a superfície da mucosa e serosa sempre difusamente hemorrágicas. O estômago pode conter uma pequena quantidade de líquido marrom avermelhado, com odor desagradável (GOHARI; PARREIRA; PRESCOTT, 2016). Sangue no ânus também é observado (GELBERG, 2013).

Na histologia observa-se necrose coagulativa aguda no epitélio das vilosidades intestinais e na porção superficial das glândulas gástricas; infiltrado inflamatório em banda majoritariamente neutrofílico separando o tecido intestinal subjacente menos acometido; congestão acentuada dos vasos da submucosa e a presença de grande número de bastonetes Gram positivos compatíveis com clostrídeos revestindo a superfície da mucosa necrótica e/ou misturada com o conteúdo intestinal. Esta última, é característica proeminente e marcante da GHC (UZAL, 2016; GOHARI; PARREIRA; PRESCOTT, 2016; SCHLEGEL *et al.*, 2012). Ao contrário da enterite causada por Parvovírus, em que as criptas são preferencialmente destruídas, neste caso as criptas são poupadas (GELBERG, 2013).

2.7 Epidemiologia

A gastroenterite hemorrágica canina pode ocorrer em qualquer raça e em qualquer idade, mas é relatada com mais frequência em cães de raça miniatura e *toy* (GOHARI, PARREIRA, PRESCOTT, 2016; GELBERG, 2013). Em alguns estudos constatou-se que a incidência de GHC foi substancialmente maior em Yorkshire terrier, Pinscher miniatura, Schnauzers miniatura, Maltês e Poodle miniatura e *toy*, seguido de raças miniatura e *toy* como um grupo (SINDERN *et al.*, 2019; MORTIER *et al.*, 2015, BURROWS, 1977). Ademais, não há predisposição de sexo, sazonal ou de idade, embora Mortier *et al.* (2015) tenha reportado uma maior prevalência no inverno; e relatos de cães de dois a quatro anos sejam mais representados (SINDERN *et al.*, 2019; GOHARI, PARREIRA, PRESCOTT, 2016; BURROWS, 1977).

2.8 Diagnóstico

Mesmo que *C. perfringens* e *C. difficile* sejam comumente descritos como enteropatógenos em cães, o diagnóstico dessas infecções ainda é um desafio (DINIZ *et al.*, 2016). Como a infecção não é bem caracterizada, ainda não existe um diagnóstico padrão ouro (MARKS, 2015). A dificuldade maior está relacionada ao fato desses microorganismos

serem habitantes normais do intestino de cães (SILVA; LOBATO, 2015), portanto, o isolamento deste microorganismo não é diagnóstico (SUCHODOLSKI *et al.*, 2012), assim como encontrar bactérias formadoras de esporos nos esfregaços de fezes, também não (WILLARD, 2015).

A detecção da toxina CPE realizada por imunoenaios enzimáticos em amostras de fezes poderia ser útil para diagnosticar a DACP, porém, a especificidade e sensibilidade da maioria dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para a detecção da enterotoxina em amostras de fezes de cão é desconhecida (WEESE, 2011) e os resultados aparentemente nem sempre se relacionam com a doença (WILLARD, 2015).

Ainda em relação à *C. perfringens*, o isolamento do clostrídio aliado à detecção do gene da enterotoxina por técnicas moleculares como PCR (Reação em cadeia da polimerase) é comumente citado correlacionado à DACP, porém, tanto CPE quanto os isolados positivos para *cpe* podem ser encontrados em cães saudáveis. Assim, esses métodos diagnósticos podem sugerir que *C. perfringens* esteja envolvido, mas eles não são confirmatórios (SILVA; LOBATO, 2015).

Portanto, um diagnóstico presuntivo é esperado, e pode ser alcançado mais adequadamente aliando os sinais clínicos, com a exclusão de outras causas e enteropatógenos envolvidos na GHC, a detecção de CPE seguido pelo isolamento de cepa positiva para *cpe* e a resolução dos sinais quando o tratamento é adequado (WILLARD, 2015; WEESE, 2011). Caso a gastroenterite hemorrágica seja fatal, a visualização de um grande número de bacilos nas superfícies mucosas associados com as lesões poderiam adicionar mais confiança ao diagnóstico final de DACP (SILVA; LOBATO, 2015; SCHLEGEL, 2012). Desde a descoberta de NetF, no entanto, a detecção do gene *netF* nos isolados tem sido realizada por vários clínicos veterinários; porém, um resultado positivo do gene *netF* confirma que essas cepas patogênicas estão presentes e, em associação com a diarreia hemorrágica, representa um único componente diagnóstico para a confirmação de DACP (SINDERN *et al.*, 2019).

Semelhantemente, para casos de suspeita de DACD, o isolamento de cepas toxigênicas, associado à detecção dos genes das toxinas A (*tcda*), B (*tcdB*) e CDT (*cdtB*) por PCR e à detecção das toxinas, por ensaios imunoenzimáticos (ELISA), diretamente das fezes, contribuem como componentes diagnósticos (SILVA, 2014). No entanto, assim como em DACP, os resultados não necessariamente se relacionam com a condição clínica do paciente e os ensaios comercialmente disponíveis para a toxina de *C. difficile* não foram validados para cães (WILLARD, 2015). Ademais, como mencionado anteriormente, *C. difficile* pode ser habitante normal do intestino dos cães, contribuindo para a complexidade do diagnóstico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a identificação dos casos de clostridiose em caninos foram analisados os livros de registros de necropsia e biópsias do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) no período de janeiro de 2014 a abril de 2019. Dados referentes à sexo, raça, idade e ao histórico clínico fornecidos pelos médicos veterinários responsáveis pelo caso, foram compilados e analisados. As alterações macroscópicas foram revisadas através do arquivo documentado de necropsia do SPV-UFRGS. Após, foram selecionadas as lâminas histológicas coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) referentes aos casos, para leitura e avaliação dos achados encontrados em cortes de intestinos delgado e grosso, e estômago através de microscópio óptico. As lesões foram avaliadas quanto à presença de hemorragia, bactérias, necrose, congestão, infiltrado inflamatório e alterações em folículo linfóide e placa de Peyer. Então, foram classificadas quanto ao grau em discreto, moderado e acentuado. Os cortes que não estavam adequados à leitura passaram novamente por processo histológico de rotina, onde os tecidos emblocados em parafina foram recortados na espessura de 3 μ m e então, corados pela técnica de HE. Após a análise de todos os casos, os cortes com alterações observadas foram selecionados para a realização de técnica histoquímica de Gram Brown-Hopps (ARRINGTON, 1992). Controle positivo foi inserido simultaneamente com as lâminas testadas e consistia de caso positivo testado anteriormente. Os dados finais obtidos foram compilados e analisados para a caracterização de aspectos epidemiológicos, macroscópicos e microscópicos.

4 RESULTADOS

Durante o período de janeiro de 2014 a abril de 2019 o SPV-UFRGS realizou um total de 2.302 exames de necropsias em caninos, com identificação de 16 casos de clostridiose, totalizando, 0,70% dos diagnósticos. A maior parte dos animais (56,25%; 9/16) possuía entre 7 a 16 anos de idade. Em um canino não foi possível identificar a idade. Praticamente todos os cães foram considerados adultos (14/16). As raças pequenas foram mais acometidas (50%, 8/16) e 43,75% (7/16) eram sem raça definida (SRD). Fêmeas e machos estavam em igual proporção (50%; 8/16).

Em relação ao histórico, os relatos mais comuns foram morte aguda em poucas horas ou dias após o início dos sinais clínicos ou súbita (87,50%, 14/16), diarreia (62,50%, 10/16) e vômito (56,25%, 9/16). Quatro casos possuíam relato de mudança na alimentação previamente ao óbito, sendo dois por ingestão de churrasco, um por ingestão de comida estragada na rua e um por acesso a adubo com fezes de galinhas e outras matérias orgânicas. Destes, observou-se que dos animais que comeram churrasco, um deles o consumo ocorreu um dia antes ao aparecimento dos sinais e o outro foi relatado três dias de consumo consecutivo com dois de apresentação clínica. O animal que provavelmente ingeriu o adubo teve o acesso quatro dias antes ao óbito, com dois dias de sinais clínicos. No cão restante não foi informado o momento em que ingeriu a comida estragada, apenas o início agudo do quadro.

Dois casos exibiam a possibilidade de imunossupressão, sendo um por ocorrência de Diabetes e doença de Cushing concomitantes, e outro por apresentar Leishmaniose. Ainda, um canino passeou em praça no dia anterior ao óbito, porém, embora seja sugestivo, não foi observado pelo tutor se o animal ingeriu algo. Assim, totaliza-se 43,75% (7/16) de cães com histórico sugestivo de fatores desencadeantes de clostridiose. Ainda como eventos prévios possivelmente relevantes, pode-se somar a estes casos, um canino acometido que teve o início dos sinais clínicos em um hotel para adestramento, morrendo um dia depois; e outro que desenvolveu o quadro no dia em que foi vacinado, com morte em dois dias.

À necropsia todos os animais (16/16) encontravam-se em estado corporal bom a regular e 68,75% (11/16) apresentavam fezes sanguinolentas na região perineal (Fig 1). Macroscopicamente foi observado principalmente conteúdo sanguinolento no lúmen, além de

mucosa e serosa avermelhadas (Fig 2, 3 e 4), e ocorreram com maior frequência no intestino delgado (87,50%, 14/16), seguido do intestino grosso (81,25%, 13/16) e estômago (68,75%, 11/16). Foram observadas lesões concomitantes em intestino grosso, intestino delgado e estômago em 50% (8/16) dos animais; 18,75% (3/16) apresentaram lesões apenas em ambos os intestinos; 12,50% (2/16) mostraram lesões apenas em um ou outro intestino e 18,75% (3/16) tiveram acometimento de um ou outro intestino concomitante com alteração em estômago. Portanto, todos os animais (16/16) tiveram algum tipo de acometimento intestinal e 68,75% (11/16) estomacal. A distribuição completa das alterações encontra-se na Tabela 1. Outras lesões como congestão, mesentério avermelhado e petéquias, foram achados eventuais nestes órgãos. Ainda, um cão apresentou endoparasitas compatíveis com *Dipylidium* sp. e *Ancylostoma* sp.

Tabela 1. Achados predominantes de necropsia por órgãos do trato gastrointestinal observados em 16 cães diagnosticados com clostridiose no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS.

Achados de necropsia	Intestino Grosso (%)	Intestino Delgado (%)	Estômago (%)
Conteúdo avermelhado no lúmen	13/16 (81,25)	12/16 (75,00)	7/16 (43,75)
Serosa avermelhada	11/16 (68,75)	12/16 (75,00)	1/16 (6,25)
Mucosa avermelhada	9/16 (56,25)	9/16 (56,25)	8/16 (50,0)
Espessamento da mucosa	7/16 (43,75)	8/16 (50,00)	1/16 (6,25)
Erosões/ulcerações	1/16 (6,25)	0/16 (0,00)	3/16 (18,75)
Deposição de fibrina	2/16 (12,50)	2/16 (12,50)	1/16 (6,25)
Evidenciação placas de Peyer	-	3/16 (18,75)	-

Fonte: o próprio autor.

Figura 1 - Necropsia de um canino com clostridiose. Observa-se sangue na região perineal.



Fonte: o próprio autor

Figura 2 - Necropsia de um canino com clostridiose. Observa-se serosa intestinal difusamente avermelhada



Fonte: o próprio autor

Figura 3 - Necropsia de um canino com clostridiose. Observa-se espessamento de parede com mucosa intestinal avermelhada, com deposição de fibrina.



Fonte: o próprio autor

Figura 4 - Necropsia de um canino com clostridiose. Observa-se mucosa do estômago avermelhada.



Fonte: o próprio autor

Microscopicamente foram avaliados 16 intestinos delgado, 15 intestinos grosso e 14 estômagos; não foi possível analisar os cortes faltantes por estarem em estado acentuado de autólise. O intestino delgado foi acometido em 93,75% (15/16) dos casos analisados, o intestino grosso em 93,33% (14/15) e o estômago em 85,71% (12/14).

Os achados microscópicos mais frequentemente observados estão apresentados na Tabela 2. Ainda, trombose em vasos sanguíneos da mucosa, foi observada em dois casos. Folículos linfóides e placas de Peyer estavam presentes nos cortes analisados de 12 casos e destes, as alterações observadas foram rarefação linfóide (2/12), necrose (1/12) e hemorragia (1/12).

O infiltrado inflamatório observado era composto predominantemente por plasmócitos e linfócitos; e por vezes, neutrófilos agregados. A maior parte (64,29%) dos intestinos grosso apresentava infiltrado constituído de linfócitos, plasmócitos e também neutrófilos, assim como no intestino delgado (56,25%; 9/16). Nos estômagos, porém, a maior parte constituía apenas linfócitos e plasmócitos (66,67%; 2/3).

Tabela 2. Frequência dos achados microscópicos, em órgãos do trato gastrointestinal; de necropsias de cães diagnosticados com clostridiose no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS.

Achados histopatológicos	Intestino Grosso		Intestino Delgado		Estômago	
	T*	%	T*	%	T*	%
Bactérias	14	(93,33)	13	(81,25)	9	(64,29)
Infiltrado inflamatório (linfócitos, plasmócitos e neutrófilos)	14	(93,33)	16	(100,0)	3	(21,43)
Hemorragia	9	(60,00)	13	(81,25)	9	(64,29)
Congestão	12	(80,00)	9	(56,25)	11	(78,57)
Necrose	11	(73,33)	12	(75,00)	5	(35,71)
Total analisado	15		16		14	

* T = total em número de animais

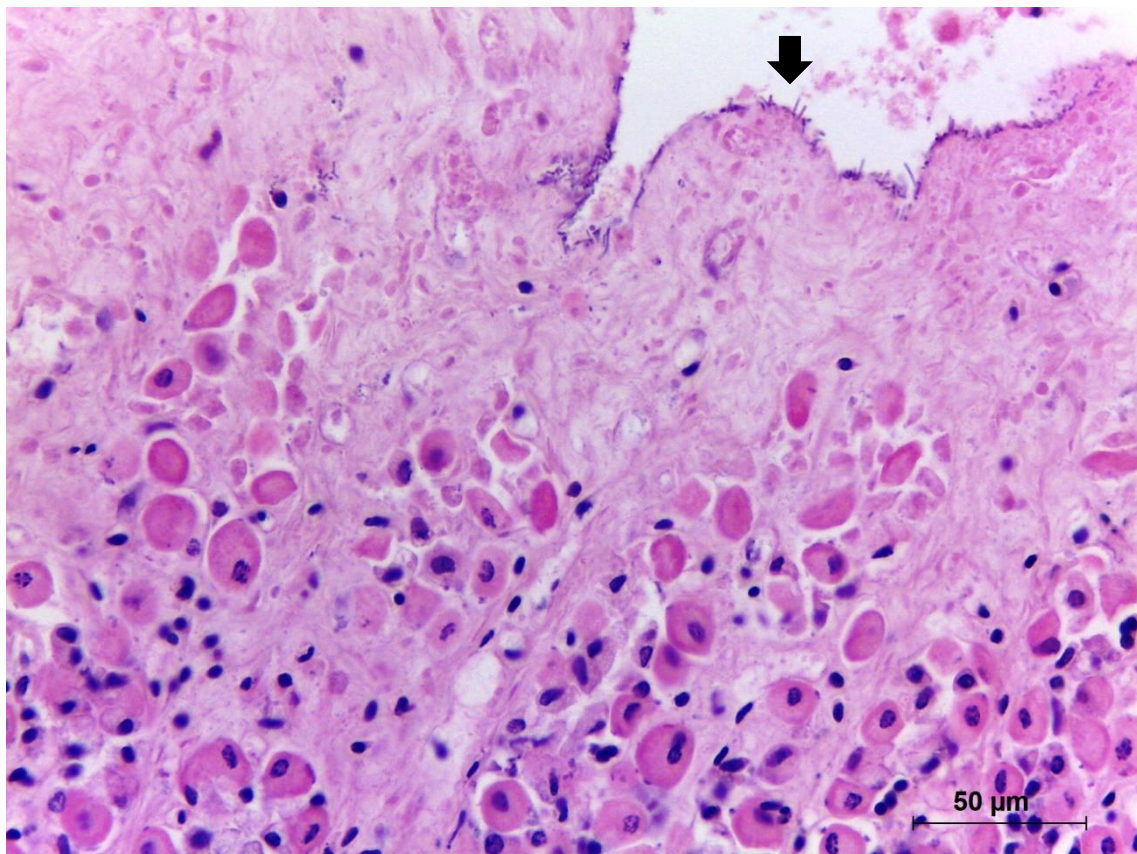
Fonte: o próprio autor.

O grau dos achados histopatológicos indicou no intestino grosso, um predomínio de hemorragia de grau acentuado, enquanto bactérias, necrose, congestão e infiltrado inflamatório apresentaram grau predominantemente discreto. No intestino delgado, entretanto, hemorragia, bactéria e necrose tiveram grau acentuado, congestão moderada e infiltrado inflamatório discreto, em sua maioria. No estômago, hemorragia e bactérias estavam na maior parte em grau acentuado, enquanto na necrose predominou o grau moderado e no infiltrado inflamatório grau discreto. Congestão predominou em igual proporção em grau moderado e

discreto. A distribuição completa dos graus está representada na Tabela 3. A hemorragia localizava-se principalmente na camada mucosa (54,35%; 25/46), seguido pela camada submucosa (23,91%; 11/46), muscular (10,87%; 5/46) e serosa (10,87%; 5/46). As lesões hemorrágicas encontradas eram de grau predominantemente acentuado nas camadas submucosa (7/11) (Fig 8), muscular (4/5) e serosa (3/5); e moderado na mucosa (11/25).

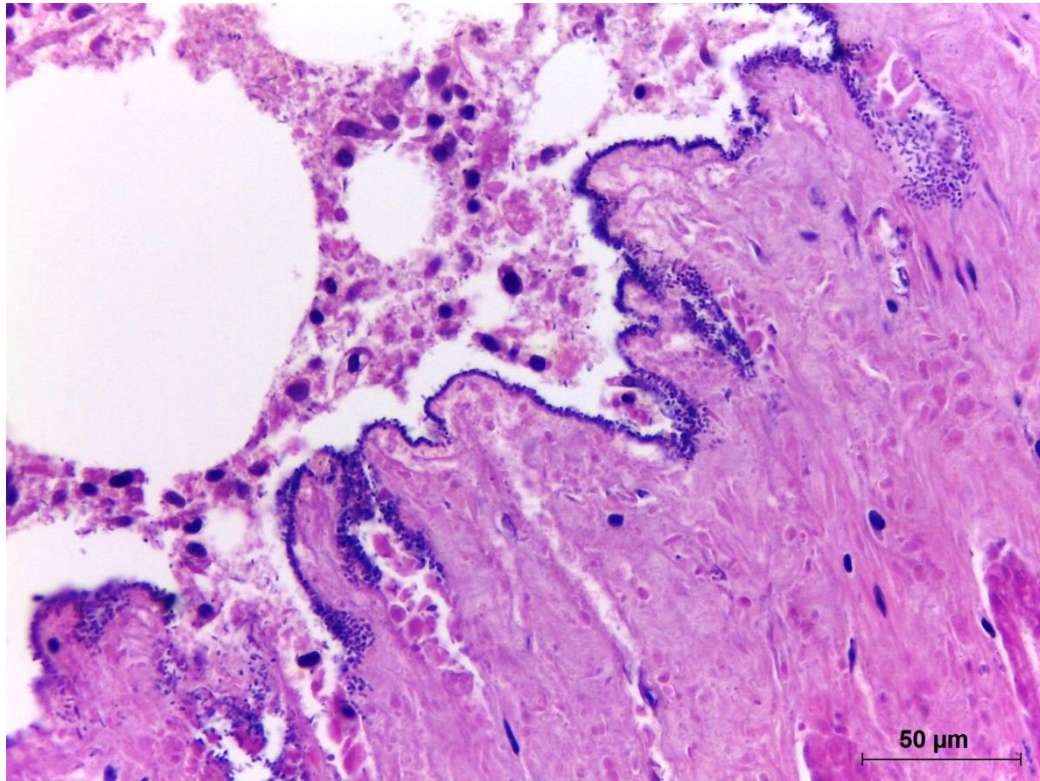
A técnica histoquímica de Gram evidenciou bactérias bacilares Gram positivas compatíveis com *Clostridium spp.* em todos os cortes testados (Fig 9).

Figura 5 - Corte histológico de estômago de um canino diagnosticado com clostridiose. Observa-se bactérias bacilares aderidas à superfície da mucosa necrótica. Coloração de HE, obj. 40X.



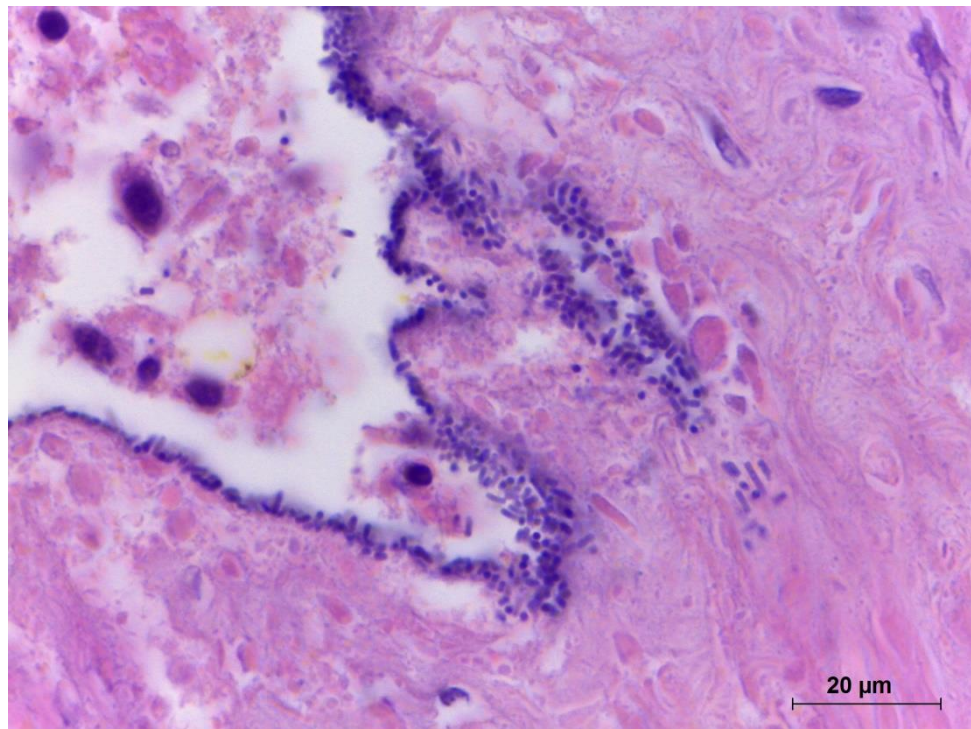
Fonte: O próprio autor

Figura 6 - Corte histológico de intestino de um canino diagnosticado com clostridiose. Observa-se bactérias bacilares aderidas ao longo da superfície da mucosa necrótica. Coloração de HE, obj. 40X



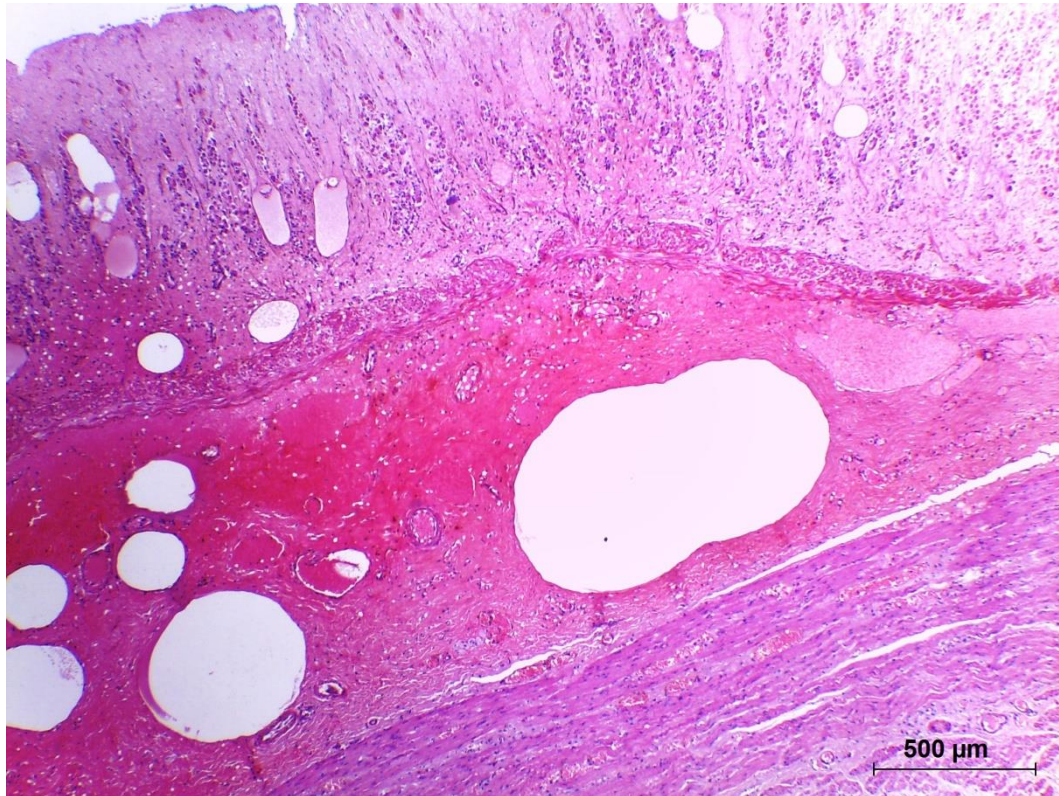
Fonte: O próprio autor

Figura 7 - Corte histológico de intestino de um canino diagnosticado com clostridiose. Bactérias bacilares aderidas à mucosa intestinal, em maior aumento (obj. 100X). Coloração de HE.



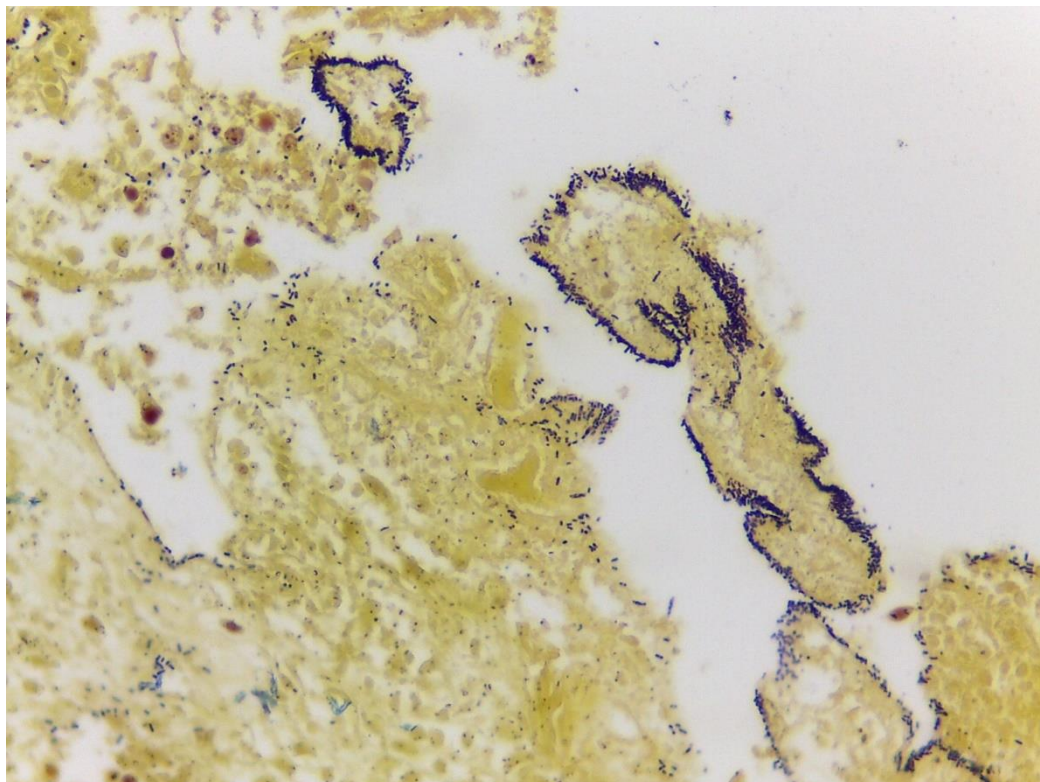
Fonte: O próprio autor

Figura 8 - Corte histológico de intestino de um canino diagnosticado com clostridiose. Observa-se hemorragia acentuada em camada mucosa e submucosa. Coloração de HE, obj.10X



Fonte: O próprio autor

Figura 9 - Corte histológico de intestino de um canino diagnosticado com clostridiose. Observa-se bactérias bacilares Gram positivas aderidas à mucosa intestinal, pela coloração de Gram, obj 40X.



Fonte: O próprio autor

Tabela 3. Grau das alterações microscópicas mais observadas, em cortes de intestino grosso, intestino delgado e estômago; de necropsias de cães diagnosticados com clostridiose no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS

Achados histopatológicos	Discreto		Moderado		Acentuado		Total
	T*	%	T*	%	T*	%	
Intestino Grosso							
Hemorragia	2	22,22	5	55,55	2	22,22	9
Bactéria	6	42,86	3	21,43	5	35,71	14
Necrose	5	45,45	4	36,36	2	18,18	11
Congestão	9	75,00	3	25,00	0	0,00	12
Infiltrado inflamatório	7	50,00	4	28,57	3	21,43	14
Intestino Delgado							
Hemorragia	4	30,00	4	30,77	5	38,46	13
Bactéria	2	15,38	5	38,46	6	46,15	13
Necrose	4	33,33	0	0,00	8	66,67	12
Congestão	3	33,33	4	44,44	2	22,22	9
Infiltrado inflamatório	8	50,00	5	31,25	2	18,75	16
Estômago							
Hemorragia	2	22,22	3	33,33	4	44,44	9
Bactéria	1	11,11	3	33,33	5	55,56	9
Necrose	1	20,00	3	60,00	1	20,00	5
Congestão	3	27,27	4	36,36	4	36,36	11
Infiltrado inflamatório	3	100,00	0	0,00	0	0,00	3

* T = total em número de animais

Fonte: o próprio autor.

5 DISCUSSÃO

A epidemiologia da doença aponta a possibilidade de qualquer idade e raça ser acometida, porém alguns autores citam a faixa etária média de dois anos ou de dois a quatro anos como a mais reportada (GOHARI; PARREIRA; PRESCOTT, 2016; GELBERG, 2013). No presente trabalho, apenas dois cães estavam dentro dessa faixa etária e a maioria deles (60%) possuía mais de sete anos; e praticamente todos os animais eram adultos. No estudo de Struble *et al.* (1994) porém, verificou-se um aumento no risco de colonização nosocomial por *C. difficile* com o aumento da idade.

Além disso, constatou-se no presente trabalho, que metade dos cães acometidos (8/16) pertencia a raças *toy* ou consideradas de porte pequeno, indo de acordo com os relatos encontrados de epidemiologia da doença; assim como a ausência de predileção por sexo (MORTIER *et al.*, 2015; GOHARI; PARREIRA; PRESCOTT, 2016; GERBERG, 2012; BURROWS, 1977). Todas as raças miniatura mais prevalentes reportadas por Mortier *et al.* (2015), estavam presentes neste estudo. Praticamente a metade restante, constituía-se de raça SRD, e a maior parte destes, no entanto, apresentava porte médio. O trabalho de Sindern *et al.* (2019) também relatou raças mistas em 20/54 dos cães.

A predisposição a raças miniaturas ainda não é bem elucidada, entretanto, alguns autores especulam que pode ser explicado pela maior predisposição genética associada à pancreatite em cães de raça pequena, uma vez que a pancreatite interrompe a produção de tripsina pancreática, fazendo com a toxina não seja destruída (GOHARI; PARREIRA; PRESCOTT, 2016). Porém, nenhum dos cães apresentava pancreatite e esta especulação é meramente uma analogia desses autores, a outras espécies afetadas por enterite fatal por *Clostridium perfringens* Tipo C que tem sido comumente associada à inibição da tripsina por alimentos como batata doce, ou por fatores inibitórios à tripsina no colostro.

No entanto, 25% dos caninos acometidos, possuía histórico de mudança na alimentação; o que provavelmente levou à uma alteração na microflora intestinal desses animais, levando a um crescimento bacteriano excessivo, seguido de uma esporulação e liberação de toxina, massivos. A disbiose é importante fator de causa apontado por diversos estudos (DINIZ, 2016; SILVA; LOBATO, 2015; MINAMOTO *et al.*, 2014; GREENE; JANG, 2015). Desses quatro animais, dois ingeriram churrasco, uma refeição culturalmente típica no estado do Rio Grande do Sul e rica em proteína. A mudança súbita para a dieta de alta proteína é bem reconhecida e relatada na literatura associada à clostridiose (SILVA;

LOBATO, 2015; ZHANG *et al.*, 2012; LUBBS *et al.*, 2012). Um estudo realizado por Zentek *et al.* (2003), em que cães tiveram suas dietas alteradas para uma rica em proteína, demonstrou um aumento de *C. perfringens* dentro de um dia após a mudança, independente da dieta prévia; e uma diminuição das bifidobactérias, que são bactérias que atuam como probióticos benéficos para a saúde.

Os dois outros animais, ingeriram comida estragada na rua e adubo com fezes de galinhas com outras matérias orgânicas, respectivamente. Estes casos, diferentemente dos anteriores, podem sugerir que provavelmente essas matérias orgânicas estavam em estado de decomposição e contaminados com alto e exacerbado número de clostrídeos toxigênicos viáveis, os quais sobreviveram à passagem pelo estômago nestes cães, não sendo possível ao organismo, combatê-los. A ingestão de alimento contaminado como fator deflagrador de clostridiose canina é também reportada na literatura (MARKS, 2015). A possibilidade destes cães não serem colonizados por clostrídeos enterotoxigênicos previamente àquele momento, também existe. Dantas (2014) sugere ainda, a combinação de mudança súbita para dieta de alta proteína com toxinas já pré-formadas neste alimento como fatores desencadeantes de GHC em um relato de um cão alimentado excessivamente por “canja de galinha”.

Segundo Silva (2014), quando a microbiota intestinal está intacta, em geral, ela impede a colonização e estabelecimento dos clostrídios em animais não colonizados e quando há algum fator que leve à disbiose, animais não colonizados ou portadores saudáveis, podem desenvolver a doença. Além dessa disbiose favorecer o crescimento excessivo desses microrganismos, Marks *et al.*(2012) ainda afirma que pode também afetar a flora intestinal de tal forma que a destruição da enterotoxina libertada fica drasticamente reduzida; ou ainda ambos os processos podem ocorrer simultaneamente. Assim, é possível que aqueles animais que consumiram matéria orgânica contaminada não tenham conseguido combatê-los devido a uma disbiose prévia por fatores desconhecidos; ou ainda, aquela matéria não estava contaminada, porém levou a uma disbiose. Estas hipóteses podem ser aplicadas àquele canino que tem como histórico o passeio em praça no dia anterior ao óbito.

Embora a literatura cite o uso de antibioticoterapia e quimioterápicos como fatores igualmente conhecidos por levarem à depleção da microbiota e desenvolvimento de clostridiose principalmente em humanos, mas também em cães, e ser mais bem conhecido como fator de risco à infecção por *C. difficile* (UZAL, 2016; DINIZ *et al.*, 2016; SILVA, 2014); não houve nenhum relato de canino tratado com antibiótico antes dos sinais clínicos. Este achado também corrobora com os de DINIZ *et al.* (2016) e DINIZ *et al.* (2018). Interessantemente, DINIZ *et al.* (2016) ainda sugere um possível sinergismo entre *C. difficile*

e *C. perfringens*, ao relatar dois casos de co-infecção destes dois agentes em cães adultos sem o uso de antibióticos anteriormente; tomando como base cinco relatos de potros (UZAL *et al.*, 2012) acometidos pela mesma síndrome e agentes e mesmas circunstâncias prévias. Assim, ambos estes estudos sugeriram que *C. perfringens* pode ter atuado como fator predisponente para *C. difficile* ou vice-versa.

Dois cães acometidos no presente estudo com diagnóstico anterior de doenças concomitantes (leishmaniose; e doença de Cushing + diabetes + piodermite crônica, respectivamente) podem ter tido a imunossupressão decorrente de suas condições, como deflagradora da clostridiose. A diminuição da reação imunológica em consequência de doenças, assim como pela administração de imunossupressores, reduzem a flora bacteriana anaeróbica normal e podem predispor ao supercrescimento bacteriano ou colonização intestinal por clostrídios; podendo também ter relação com a característica nosocomial igualmente observada nesta doença (SILVA, 2014; MARKS, 2015; SASAKI *et al.*, 1999). Segundo Silva (2014), o uso destes medicamentos, associado à internação, são os principais fatores de risco para desenvolvimento de diarreia associada a *C. difficile* em cães. Além de Silva (2014), outros estudos também evidenciaram a internação como fator predisponente para a clostridiose canina (STRUBLE *et al.*, 1994), e no presente estudo, apenas um cão apresentava essa condição, ao ser internado por miíase. É possível que o cão com histórico único de início dos sinais clínicos concomitante ao dia de vacinação, tenha sido submetido à estresse, reação vacinal, ou até mesmo sido colonizado por *Clostridium spp.* ambiental, por estar em ambiente hospitalar no momento da vacinação; entretanto é impossível determinar. O que se sabe, porém, é que o tempo de incubação de *C. perfringens* Tipo A é bastante curto, de seis a vinte e quatro horas (CARTER, 1998). O outro canino que teve o quadro clínico em um hotel para adestramento, no dia seguinte; pode ter sido contaminado pelo ambiente ou por outros cães, visto que trata-se de um local de aglomeração; além da possibilidade de ter ingerido algo diferente do habitual. Estresse físico ou emocional também poderiam atuar como possíveis fatores causais; mas são apenas especulações.

Segundo Zhang *et al.* (2012), qualquer lesão na mucosa do intestino também pode predispor um indivíduo a alterações na flora bacteriana, resultando em crescimento excessivo de clostrídios. A indigestão leve também pode fazer com que os intestinos tornem-se estáticos, impedindo o fluxo normal de substâncias tóxicas do sistema. Dessa forma, embora exista uma forte e reconhecida associação desta enterotoxicose com a ingestão de alta proteína e também com a administração de antibióticos, uma série de fatores podem estar relacionados, contribuindo para a complexidade da determinação da patogênese e etiologia da clostridiose.

Oito animais neste trabalho não apresentavam histórico clínico relevante para levantar uma suspeita de causa, ou os tutores encontraram o animal morto sem observar sinais clínicos prévios, e portanto, não há como determinar possíveis fatores desencadeantes de clostridiose.

O relato de vômito, diarreia sanguinolenta e morte em poucas horas ou poucos dias após o início dos sinais clínicos, ou até mesmo morte súbita, associado às alterações anatomopatológicas observadas, vão de acordo com as características da Síndrome da Diarreia Hemorrágica Aguda associada à *Clostridium* spp. nos cães estudados.

Diversos autores afirmam o caráter variável da clostridiose enterotóxica em caninos, variando de diarreia leve e auto-limitante à enterite aguda necrohemorrágica potencialmente fatal. Entretanto, os sinais clínicos leves a auto-limitantes são mais frequentes, e se corretamente diagnosticado, uma resposta e cura rápida são esperadas; sendo fatal, portanto, em uma pequena proporção de casos (LEIPIG-RUDOLPH *et al.*, 2018; GOHARI; PARREIRA; PRESCOTT, 2016; WILLARD, 2015; MINAMOTO *et al.*, 2014; SCHLEGEL, 2012; MARKS, 2015). Este caráter fatal incomum descrito na literatura é compatível com o número de cães necropsiados e diagnosticados com clostridiose levantados no presente trabalho. Assim, o óbito e os achados patológicos encontrados, que imprimiam predomínio de lesões hemorrágicas em intestino e estômago, vão de acordo com a forma aguda e fatal da doença, mais conhecida por Síndrome da Diarreia Hemorrágica Aguda ou Gastroenterite Hemorrágica Canina, além de outros termos já descritos. Além disso, os sinais clínicos de diarreia, vômito e morte aguda após o início do quadro, relatados no histórico dos animais, confirmam os sinais clínicos reportados para essa síndrome; e o fato de todos os animais estarem em estado corporal de bom a regular no momento da necropsia, confirma também, o caráter agudo ou periagudo esporádico da doença (GOHARI; PARREIRA; PRESCOTT, 2016). Algumas evidências de que tanto a infecção por *C. perfringens* quanto por *C. difficile* possa resultar nesta condição existem (MARKS, 2015; CAVE *et al.*, 2002; MARKS *et al.*, 2002), porém trabalhos recentes afirmam que ainda há poucas e incompletas informações sobre os aspectos clínicos e a caracterização da DACD, sendo melhor caracterizada a GHC associada à *C. perfringens* (DIAB;UZAL;SONGER, 2016; WILLARD, 2015).

As lesões mais frequentes observadas ocorreram primeiramente em intestino delgado, seguido de intestino grosso e estômago. Embora diversos autores mencionem o comensalismo de *Clostridium* spp. difusamente pelo trato gastrointestinal, alguns não citam o estômago como órgão acometido além dos intestinos. Estudos de Unterer *et al.* (2014) e Leipig-Rudolph *et al.* (2018), que avaliaram cães *in vivo* com diarreia hemorrágica aguda por endoscopia seguida de biópsia; os resultados mostraram que nenhum dos caninos, mesmo apresentando

vômitos com conteúdo hemorrágico, tinham sinais de inflamação aguda significativa ou destruição da superfície epitelial da mucosa gástrica. Dessa forma, foi sugerido que a necrose gástrica observada em estudos prévios de cães necropsiados com diarreia hemorrágica poderia, portanto, representar alterações morfológicas decorrentes de autólise; e que o vômito poderia ser explicado pelas erosões duodenais, já que todo o trato intestinal costuma estar acometido nessa síndrome. Ainda, os autores afirmam que o termo Gastroenterite Hemorrágica Aguda, portanto, é inadequado.

Entretanto, no presente trabalho, 68,75% (11/16) dos cães tiveram alterações macroscópicas em estômago e 85,71% (12/14) dos estômagos analisados apresentaram lesões histológicas compatíveis com clostridiose; corroborando com o reportado por outros trabalhos (UZAL, 2016; GOHARI; PARREIRA; PRESCOTT, 2016; DINIZ *et al.*, 2016; GELBERG, 2013; SCHLEGEL *et al.*, 2012). Gelberg (2013) afirma ainda, que a necrose hemorrágica da mucosa pode ocorrer em qualquer lugar a partir do estômago em direção ao intestino. Outros sugerem que a gastrite hemorrágica ocorre, mas é ocasional (UZAL, 2016). Além disso, segundo Leipzig-Rudolph *et al.* (2018) os estudos anteriores que caracterizam as lesões anatomopatológicas de cães acometidos por SDHA foram limitados por fatores como a dificuldade de interpretar alterações intestinais devido às amostras coletadas serem *post mortem*, o que conferia autólise; além do baixo número de casos reportados. No entanto, no presente trabalho, dos dezesseis intestinos grosso, delgado e estômagos estudados; apenas um intestino grosso e dois estômagos não foram possíveis analisar por motivo de autólise; sendo o número de análise superior ao referido autor.

Os achados de necropsia mais observados em ambos os intestinos foram conteúdo sanguinolento a avermelhado no lúmen, serosa e mucosa avermelhadas e espessamento de mucosa, além de estado corporal bom a regular e fezes sanguinolentas na região perineal, correspondendo a frequências maiores de 50%. Nos estômagos, entretanto, apenas mucosa avermelhada foi observada em metade dos casos, seguido de conteúdo sanguinolento a avermelhado no lúmen (43,75%) e erosões ou ulcerações (18,75%). Deposição de fibrina, evidenciação de placas de Peyer e erosões ou ulcerações foram achados macroscópicos menos frequentes. Embora alguns trabalhos não tenham mostrado acometimento do estômago, os achados de necropsia aqui observados foram semelhantes aos reportados na literatura para casos fatais de GHC (GOHARI; PARREIRA; PRESCOTT, 2016; UZAL, 2016; DANTAS, 2014; GELBERG, 2013; SCHLEGEL *et al.*, 2012; SASAKI *et al.*, 1999) podendo ser considerados, portanto, como achados típicos, porém não patognomônicos, para a doença. E

ainda, confirmam o caráter difuso, mas também variável na distribuição das lesões no trato gastrointestinal.

Paralelamente, na análise histológica também foi observado acometimento tanto intestinal quando estomacal, em frequências altas (acima de 85,71%). Bactérias semelhantes a clostrídios aderidas na superfície da mucosa ou no lúmen, infiltrado inflamatório composto em sua maioria por linfócitos, plasmócitos e neutrófilos; hemorragia; necrose e congestão; foram achados histológicos predominantes nos intestinos grosso e delgado, estando em frequências maiores de 50%. No estômago, por sua vez, houve um predomínio de congestão, hemorragia e bactérias; enquanto necrose e infiltrado inflamatório tiveram frequência de 35,71% e 21,43% respectivamente.

Quanto à gravidade das lesões destes achados, foi possível perceber que no intestino grosso se tem uma lesão hemorrágica mais acentuada com o restante das outras alterações de grau discreto. O intestino delgado apresentou a maior severidade das lesões, com predomínio de hemorragia, bactéria e necrose acentuados; e congestão moderada, indo em contraste com o citado por Uzal (2016) em que a colite costuma ser mais severa nos casos de GHC. Na maior parte dos estômagos, hemorragia e bactérias estavam em grau acentuado, e a necrose e o infiltrado inflamatório, além de poucos frequentes, quando presentes eram em sua maioria moderados e discretos, respectivamente. Congestão predominou em igual proporção em grau moderado e discreto. Embora as lesões hemorrágicas tenham sido localizadas principalmente na camada mucosa (54,35%), seguida da submucosa (23,91%), o caráter acentuado foi predominante na camada submucosa (63,63%) e moderado na mucosa (44%).

Sendo assim, os achados anatomopatológicos confirmam principalmente o grau hemorrágico e acentuado como predominantes nos casos de gastroenterite hemorrágica canina, mas também evidenciam a necrose da mucosa e as bactérias bacilares presentes nesta e em detritos necróticos no lúmen; indo de acordo com o reportado na literatura (UZAL, 2016; GOHARI; PARREIRA; PRESCOTT, 2016; ZHANG *et al.*, 2012; SCHLEGEL *et al.*, 2012, SASAKI *et al.*, 1999)

As lesões histológicas analisadas no presente estudo, são semelhantes às encontradas nas biópsias por endoscopias no trabalho recente de Leipzig-Rudolph *et al.* (2018); exceto pelo grau de severidade que foi maior no intestino grosso, com necrose moderada à acentuada e pela principal característica histopatológica ter sido a inflamação necrosante; e não a hemorragia.

6 CONCLUSÃO

Os caninos mais acometidos pela infecção por *Clostridium* ssp. foram os de pequeno porte ou *toy*, principalmente adultos a idosos, e não foi observada predisposição sexual. Vômito, diarreia sanguinolenta e morte em poucas horas ou poucos dias após o início do quadro, foram os sinais clínicos mais relatados previamente ao óbito. Foram observadas alterações tanto no intestino grosso quanto no intestino delgado e estômago, confirmando o caráter difuso no trato gastrointestinal. Os principais achados macroscópicos foram estado corporal bom a regular, fezes sanguinolentas na região perineal, conteúdo sanguinolento no lúmen e mucosa e serosa difusamente avermelhadas. Na histologia, o mais observado foi hemorragia acentuada, bactérias bacilares Gram positivas aderidas na mucosa e no lúmen intestinal, necrose e congestão. Os principais fatores envolvidos no desenvolvimento da clostridiose canina relatados foram mudança na dieta e imunossupressão, principalmente por levarem à disbiose intestinal. A ausência de causa suspeita, aliada à dificuldade de estabelecer um diagnóstico preciso *ante mortem*, principalmente pelo fato de cães saudáveis também abrigarem esses clostrídios toxigênicos e as toxinas de forma comensal, mas também pelo caráter hiperagudo fatal, colaboram para a complexidade da determinação da patogenia da doença necessitando de mais estudos.

REFERÊNCIAS

- ARRINGTON, J. B. Bacteria, Fungi, and other microorganisms. *In: PROPHET, E. B. et al (Ed.). Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1992. Cap. 21. p. 221-222.
- BARTLETT, M. L.; WALKER, H. W.; ZIPRIN, R. Use of dogs as an assay for *Clostridium perfringens* enterotoxin. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 23, n. 1, p. 196-197, jan. 1972.
- BURROWS, C. F. Canine hemorrhagic gastroenteritis [Diseases of unknown etiology, dogs]. **Journal-American Animal Hospital Association (USA)**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 451-458, jan. 1977.
- CARTER, G. R. Clostrídio. *In: CARTER, G. R.. Fundamentos de Bacteriologia e Micologia Veterinária*. São Paulo: Roca, 1998. Cap. 14. p. 128-135.
- CARTER, G. R. *et al. Essentials of veterinary bacteriology and mycology*. 4. ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1991.
- CAVALCANTI, M. *et al.* Purificação de toxinas produzidas por *Clostridium perfringens*: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 151-164, jun. 2004.
- CAVE, N. J. *et al.* Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. **Journal-American Veterinary Medical Association**, [s.l.], v. 221, n. 1, p. 52-59, jul. 2002.
- CLOOTEN, J. *et al.* Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. **Veterinary microbiology**, [s.l.], v. 129, n. 1-2, p. 209-214, may. 2008.
- DIAB, S. S.; UZAL, F. A.; SONGER, J. G. Diseases produced by *Clostridium difficile*. *In: UZAL, F. A.; SONGER, J. G.; PRESCOTT, J. F.; POPOFF, M. R.(Ed.). Clostridial Diseases of Animals*. Ames: John Wiley & Sons, 2016. p. 177-195.
- DUCHESNES, C. *et al. Genus Clostridium: Clostridia in medical, veterinary and food microbiology - Diagnosis and typing*. Luxembourg: European Communities, 2006.
- GELBERG, H.B. Sistema Alimentar, Peritônio, Omento, Mesentério e Cavidade Peritonal. *In: ZACHARI, James F.; McGAVIN, M.D. Bases da Patologia Veterinária*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Seção 2, cap. 7, p. 324-406.
- GLENNY, A.T. *et al.* Multiple toxins produced by some organisms of the *Cl. welchii* group. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, [s.l.], v. 37, p. 53-74. 1933.
- GOHARI, I. M. ; PARREIRA, V. R.; PRESCOTT, J. F. NetFassociated necrotizing enteritis of foals and canine hemorrhagic gastroenteritis. *In: UZAL, F. A.; SONGER, J.*

G.; PRESCOTT, J. F.; POPOFF, M. R.(Ed.). **Clostridial Diseases of Animals**. Ames: John Wiley & Sons, 2016. p. 117-122.

GOHARI, M. I. *et al.* A novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated with both fatal canine hemorrhagic gastroenteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis. **PLoS One**, São Francisco, v. 10, n. 4, e0122684. 2015.

GOHARI, M. I. *et al.* NetF-producing *Clostridium perfringens*: clonality and plasmid pathogenicity loci analysis. **Infection, Genetics and Evolution**, [s.l.], v. 49, p. 32-38, apr. 2017.

GONÇALVES, C.; *et al.* Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 42, n. 5, p. 1933-1939, may. 2004.

GREENE, C. E.; PRESCOTT, J. F. Streptococcal and other gram-positive bacterial infections. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Saunders, 1998. p. 205-213.

GREENE, C. G.; JANG, S. S. Infecções por Bactérias Anaeróbicas. In: GREENE, C. E. **Doenças Infeciosas em Cães e Gatos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. Cap 39. p. 890-900.

HALL, E. J.; SIMPSON, K. W. (Ed.). Doenças do Intestino Delgado. In: ETINGER, S. J.; FELDMAN, E. C.. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. Cap. 137. p. 1247-1305.

IDRISSI, A. H. E.; WARD, D. E. Enterotoxaemia and gas gangrene. In: LEFRÈVE, P. C. *et al.*(ed). **Infectious and Parasitic Diseases of Livestock**. Paris: Lavoisier, 2010. p 1207-1215.

KEEL, K. *et al.* Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. **Journal of clinical microbiology**, [s.l.], v. 45, n. 6, p. 1963-1964, jun. 2007.

KEYBURN, A.L. *et al.* NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. **PLoS Pathogens**, São Francisco, v. 4, n. 2, e26. 2008.

LOBATO, F. C. F; SALVARANI, F. M.; DE ASSIS, R. A. Clostridioses dos pequenos ruminantes Clostridiosis of small ruminants. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias RPCV**, [s.l.], v. 102, n. 561-562, p. 23-34, jan. 2007.

LOBATO, F. C. F. *et al.* Clostridioses dos animais de produção. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 20, p. 29-48, 2013.

LUBBS, D. C. *et al.* Dietary protein concentration affects intestinal microbiota of adult cats: a study using DGGE and qPCR to evaluate differences in microbial populations in the feline gastrointestinal tract. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, [s.l.], v. 93, n. 1, p. 113-121, feb. 2009.

LYERLY, D. M.; KRIVAN, H. C.; WILKINS, T. D. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 1-18, jan. 1988.

MARKS, S. L.. Infecções Bacterianas Entéricas. *In*: GREENE, C. E. **Doenças Infeciosas em Cães e Gatos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. Cap 37. p. 850-861.

MARKS, S.L. *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Ohio, v. 16, n. 5, p. 533-540, sep/oct. 2002.

MARKS, S.L. *et al.* Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Ohio, v. 25, n. 6, p. 1195-1208, nov/dec. 2011.

McDONEL, J. L. Toxins of *Clostridium perfringens* types A, B, C, D and E. *In*: DORNER, F.; DREWS, J. (Ed.). **Pharmacology of bacterial toxins**. Oxford: Pergamon Press, 1986. p. 477-517.

MORTIER, F. *et al.* Acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs: 108 cases. **Veterinary Record**, London, v. 176, n. 24, p. 627-627, jun. 2015.

NORMAN, K.N. *et al.* Prevalence and genotypic characteristics of *Clostridium difficile* in a closed and integrated human and swine population. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 77, n. 16, p. 5755-5760, aug. 2011.

PIRES, C. E. T. **Principais bactérias presentes em doenças transmitidas por alimentos (DTAs)**. 2011. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

PRIYA, A. K. *et al.* Prevalence of enteropathogens and their antibiotic sensitivity pattern in puppies with hemorrhagic gastroenteritis. **Veterinary World**, Wankaner, v. 10, n. 8, p. 859-863, aug. 2017.

ROOD, J. I. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. **Anaerobe**, [s.l.], v. 53, p. 5-10, Oct. 2018.

ROOD, J. I. General Physiological and Virulence Properties of the Pathogenic Clostridia. *In*: UZAL, F. A.; SONGER, J. G.; PRESCOTT, J. F.; POPOFF, M. R.(Ed.). **Clostridial Diseases of Animals**. Ames: John Wiley & Sons, 2016. p. 7-12.

SAMIE, A. *et al.* PCR detection of *Clostridium difficile* triose phosphate isomerase (tpi), toxin A (tcdA), toxin B (tcdB), binary toxin (cdtA, cdtB), and tcdC genes in Vhembe District, South Africa. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, [s.l.], v. 78, n. 4, p. 577-585, apr. 2008.

SASAKI, J. *et al.* Hemorrhagic enteritis associated with *Clostridium perfringens* type A in a dog. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 61, n. 2, p. 175-177, feb. 1999.

SCHOTTE, U.; TRUYEN, U.; NEUBAUER, H. Significance of β 2-Toxigenic *Clostridium perfringens* Infections in Animals and Their Predisposing Factors

– A Review. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, [s.l.], v. 51, n. 10, p. 423-426. 2004.

SCHWAN, C. *et al.* *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. **PLoS Pathogens**, São Francisco, v. 5, n. 10, oct. 2009.

SILVA, R. O. S. *Clostridium difficile*: padronização e avaliação de métodos de diagnóstico, ocorrência em seres humanos e animais e desenvolvimento de um modelo experimental em hamsters. 2014. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

SILVA, R. O. S. *et al.* *Clostridium difficile* ribotypes in humans and animals in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 8, p. 1062-1065, dec. 2015.

SILVA, R. O. S. *et al.* *Clostridium perfringens* and *C. difficile* in parvovirus-positive dogs. **Anaerobe**, [s.l.], v. 48, p. 66-69, dec. 2017.

SILVA, R. O. S. *et al.* Detection of toxins A/B and isolation of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from dogs in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 133-137, mar. 2013b

SILVA, R. O. S. *et al.* Neonatal diarrhea in piglets associated with cpb-2 positive *Clostridium perfringens*. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 94-98. 2013a.

SILVA, R. O. S.; LOBATO, F.C. *Clostridium perfringens*: a review of enteric diseases in dogs, cats and wild animals. **Anaerobe**, [s.l.], v. 33, p. 14-17, jun. 2015.

SINDERN; N. *et al.* Prevalence of *Clostridium perfringens* netE and netF toxin genes in the feces of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Ohio, v. 33, n. 1, p. 100-105, jan. 2019.

SONGER, J. G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. **Clinical Microbiology Reviews**, Minneapolis, v. 9, n. 2, p. 216-234. 1996.

SONGER, J. G.; HARMON, A. E.; KEEL, M. K. Toxins of *Clostridium difficile*. In: UZAL, F. A.; SONGER, J. G.; PRESCOTT, J. F.; POPOFF, M. R.(Ed.). **Clostridial Diseases of Animals**. Ames: John Wiley & Sons, 2016. p. 61-70.

SONGER, J. G.; UZAL, F. A. Clostridial enteric infections in pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, California, v. 17, n. 6, p. 528-536. 2005.

STONE, N. E. *et al.* More than 50% of *Clostridium difficile* isolates from pet dogs in Flagstaff, USA, carry toxigenic genotypes. **PLoS One**, São Francisco, v. 11, n. 10, p. e0164504, oct. 2016.

STRUBLE, A. L. *et al.* Fecal shedding of *Clostridium difficile* in dogs: a period prevalence survey in a veterinary medical teaching hospital. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, [s.l.], v. 6, n. 3, p. 342-347, jul. 1994.

- SUCHODOLSKI, J. S. *et al.* The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. **PLoS One**, São Francisco, v. 7, n. 12, e51907, dec. 2012
- SUGITA, K. *et al.* Oral faecal microbiota transplantation for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in a dog: a case report. **BMC Veterinary Research**, [s.l.], v. 15, n. 1, p. 15, jan. 2019
- TRIOLO, A.; LAPIN, M. R. Doenças Médicas Agudas do Intestino Delgado. In: TAMS, T. R.. **Gastroenterologia de Pequenos Animais**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2005. Cap. 6. p. 207-245.
- TURK, J. *et al.* Enteric *Clostridium perfringens* infections associated with parvo viral enteritis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 200, n. 7, p. 991-994, apr. 1992.
- UNTERER, S. *et al.* Endoscopically visualized lesions, histologic findings, and bacterial invasion in the gastrointestinal mucosa of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndromes. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Ohio, v. 28, n. 1, p. 52-58, jan/feb. 2014.
- UZAL, F. A. Diseases produced by *Clostridium perfringens* type A in mammalian species. In: UZAL, F. A.; SONGER, J. G.; PRESCOTT, J. F.; POPOFF, M. R.(Ed.). **Clostridial Diseases of Animals**. Ames: John Wiley & Sons, 2016. p. 109-116.
- UZAL, F. A. *et al.* *Clostridium perfringens* type C and *Clostridium difficile* co-infection in foals. **Veterinary microbiology**, [s.l.], v. 156, n. 3-4, p. 395-402, may. 2012.
- VOS, P. *et al.* **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. Athens: Springer, 2009. v. 3.
- WEESE, J. S. Bacterial enteritis in dogs and cats: diagnosis, therapy, and zoonotic potential. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Maryland Heights, v. 41, n. 2, p. 287-309, mar. 2011.
- WEESE, J. S. *et al.* The Roles of *Clostridium difficile* and Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in Diarrhea in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Ohio, v. 15, n. 4, p. 374-378, jul/aug. 2001.
- WEESE, J. S.; ARMSTRONG, J. Outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease in a small animal veterinary teaching hospital. **Journal of veterinary internal medicine**, [s.l.], v. 17, n. 6, p. 813-816, nov/dec. 2003.
- WILLARD, M. D. Distúrbios do Sistema Digestório. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. Cap. Desordens do trato intestinal, p. 155-192.
- WILSDON, A.S. Observations on the classification of *B. Welchii*. **Second Report**, University of Cambridge Institute of Animal Pathology, Cambridge, p. 53-85. 1931.

ZENTEK, J. *et al.* Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, [s.l.], v. 87, n. 11-12, p. 397-407, dec. 2003.

ZHANG, Y.; HOU, Z.; MA, J. Hemorrhagic enterocolitis and death in two felines (*Panthera tigris altaica* and *Panthera leo*) associated with *Clostridium perfringens* type A. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, [s.l.], v. 43, n. 2, p. 394-396, jun. 2012.